

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

**Prävalenz, Diagnostik und Bedeutung von *Borrelia*
burgdorferi und *Anaplasma phagocytophilum* bei Hunden im
Raum München**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Charlotte Barth

aus Heidelberg

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	<i>Borrelia burgdorferi</i>	2
1.1.	Systematik	2
1.2.	Morphologie	4
1.3.	Vektor <i>Ixodes</i> spezies	6
1.3.1.	Verbreitung und Infektionsraten von <i>Ixodes</i> spezies	7
1.3.2.	Exposition und Übertragung	9
1.4.	Epidemiologie beim Hund	10
1.5.	Verlauf der Infektion	11
1.6.	Symptome der Lyme-Borreliose	12
1.6.1.	Symptome beim Mensch	12
1.6.1.1.	Symptome nach Infektion mit <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	13
1.6.1.2.	Symptome nach Infektion mit anderen <i>Borrelia</i> -Spezies	14
1.6.2.	Symptome beim Hund	15
1.6.2.1.	Experimentelle Infektionen	15
1.6.2.1.1.	Experimentelle Infektionen mit <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	15
1.6.2.1.2.	Experimentelle Infektionen mit anderen <i>Borrelia</i> -Spezies	16
1.6.2.2.	Feldinfektionen	16
1.7.	Diagnostik	19
1.7.1.	Direkte Nachweismethoden	19
1.7.1.1.	Kultivierung von <i>Borrelia burgdorferi</i>	19
1.7.1.2.	Polymerase-Kettenreaktion	19
1.7.2.	Indirekte Nachweismethoden	20
1.7.2.1.	Immunfluoreszenztest	20
1.7.2.2.	Enzyme-linked immunosorbent assay	21
1.7.2.3.	Western blot	22
2.	<i>Anaplasma phagozytophilum</i>	23
2.1.	Systematik	23
2.2.	Morphologie	24
2.3.	Vektor <i>Ixodes</i> spezies	26
2.3.1.	Verbreitung und Infektionsraten von <i>Ixodes</i> spezies	26

2.3.2.	Exposition und Übertragung	26
2.4.	Epidemiologie	27
2.5.	Verlauf der Infektion	27
2.6.	Symptome der Granulozytären Anaplasmosen	28
2.6.1.	Humane Granulozytäre Anaplasmosen	29
2.6.2.	Canine Granulozytäre Anaplasmosen	29
2.6.2.1.	Experimentelle Infektionen	30
2.6.2.2.	Feldinfektionen	30
2.7.	Diagnostik	32
2.7.1.	Direkte Nachweismethoden	32
2.7.1.1.	Kultivierung von <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	32
2.7.1.2.	Mikroskopische Untersuchung von Blutaussstrichen	32
2.7.1.3.	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.7.2.	Indirekte Nachweismethoden	33
2.7.2.1.	Immunfluoreszenztest	34
2.7.2.2.	Enzyme-linked immunosorbent assay	34
III.	STUDIE I	35
IV.	STUDIE II	44
V.	STUDIE III	68
VI.	DISKUSSION	91
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	104
VIII.	SUMMARY	106
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	108
X.	DANKSAGUNG	131

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A.</i>	<i>Anaplasma</i>
Abb.	Abbildung
ARDS	acute respiratory distress syndrome
AP	alkaline phosphatase (alkalische Phosphatase)
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat)
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly Medium
BSK II	Barbour-Stoener-Kelly II Medium
<i>C.</i>	<i>Cowdria</i>
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
<i>D.</i>	<i>Dirofilaria</i>
DC	dense cored cells
DFM	Dunkelfeldmikroskopie
DNA	Deoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Ehrlichia</i>
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetic-acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
<i>e. g.</i>	for example (zum Beispiel)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	„ <i>et alii</i> “ (und andere)
FITC	fluorescein isothiocyanate (Fluorescein-Isothiocyanat)
HGE	humane granulozytäre Ehrlichiose
HL-60	human promyelocytic leukemia cell lines
HRP	horseraddish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
k. A.	keine Angabe
KELA	kinetic enzyme-linked immunosorbent assay
kDa	Kilodalton
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>

IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IR ₆	invariable region 6
MLEE	multilocus enzyme electrophoresis
min	minutes (Minuten)
<i>N.</i>	<i>Neorickettsia</i>
neg.	negative (negativ)
n. b.	nicht bestimmt
NBT	nitro-blue tetrazolium (Nitroblau-Tetrazolium)
NPV	negative predictive value (negativer prädiktiver Wert)
Osp A	Outer surface-protein A
Osp C	Outer surface-protein C
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pos.	positive (positiv)
PPV	positive predictive value (positiver prädiktiver Wert)
RC	reticulate cells
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sec	seconds (Sekunden)
sl	sensu lato
spp.	species pluralis
ss	sensu stricto
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
VlsE	variable major protein-like sequence, expressed
<i>W.</i>	<i>Wolbachia</i>
WB	Western blot
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Borrelia (*B.*) *burgdorferi* sensu lato (sl), ein schraubenförmiges, motiles Bakterium aus der Familie der *Spirochetaceae* und Erreger der Lyme-Borreliose, sowie *Anaplasma* (*A.*) *phagozytophilum*, ein obligat intrazelluläres, Gram-negatives Bakterium aus der Familie der *Anaplasmataceae* und Erreger der granulozytären Anaplasmose, infizieren sowohl Menschen als auch Hunde in der gesamten nördlichen Hemisphäre (BAKKEN et al., 1996; FRITZ & KJEMTRUP, 2003; LITTMAN, 2003; STUEN, 2007). Zwar kann eine Infektion mit beiden Erregern zu klinischer Symptomatik führen (STRAUBINGER et al., 1997; EGENVALL et al., 1998; CHANDRASHEKAR et al., 2010; SCORPIO et al., 2011), die tatsächliche klinische Relevanz einer natürlichen Infektion mit diesen Erregern beim Hund ist jedoch nach wie vor unklar.

Zur Diagnose von *B. burgdorferi* sl sowie *A. phagozytophilum* stehen viele labordiagnostische Methoden zur Verfügung, darunter sowohl indirekte als auch direkte Nachweisverfahren (CARRADE et al., 2009; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Jedoch existieren bisher wenige Studien, die verschiedene in der veterinärmedizinischen Praxis verwendete Testsysteme direkt miteinander vergleichen.

Ziel der ersten Studie war es, die Prävalenz beider Erreger bei Hunden im Raum München zu bestimmen sowie deren klinische Bedeutung bei natürlich infizierten Hunden zu untersuchen. Ziel der zweiten Studie war der Vergleich unterschiedlicher Testsysteme zum Nachweis von *B. burgdorferi* sl, einschließlich eines Immunfluoreszenztests (IFA), eines kinetischen enzyme-linked immunosorbent assays (KELA), eines kommerziell erhältlichen enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) auf Basis der C₆-Technologie (SNAP[®]4Dx[®], IDEXX, Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) und diese mit dem Goldstandard Western blot (WB) zu vergleichen. Ziel der dritten Studie war der Vergleich unterschiedlicher Testsysteme zum Nachweis von *A. phagozytophilum*, darunter ein IFA und der SNAP[®]4Dx[®], und die Ergebnisse mit denen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu vergleichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Borrelia burgdorferi*

Borrelia (B.) burgdorferi infiziert Menschen wie auch Hunde in Ländern mit moderatem Klima in Eurasien ebenso wie in Nordamerika (STANEK et al., 2012).

1.1. Systematik

Borrelien gehören zu den Bakterien. Taxonomisch werden Borrelien der Ordnung der *Spirochaetales* zugeordnet. Die *Spirochaetales* beinhalten aktuell drei Familien: die *Brachyspiraceae*, die *Leptospiraceae* sowie die *Spirochetaceae*. Desweiteren existieren unklassifizierte *Spirochaetales*, die noch keine taxonomische Zuordnung haben. Die *Spirochetaceae* beinhalten neben der Gattung *Borrelia* zwei weitere Gattungen, nämlich *Spirochaeta* und *Treponema* (GILLESPIE et al., 2011).

Zugehörige der Gattung *Borrelia* werden in zwei Kategorien eingeteilt, die Erregergruppe des Rückfallfiebers (relapsing fever *borreliæ*, z. B. *Borrelia hermsii*) und die Gruppe der Erreger, die die Lyme-Borreliose verursachen (Lyme-Borreliose-Komplex) (ROBERTS et al., 2000; MARGOS et al., 2011). Die Unterscheidung verschiedener *Borrelia*-Spezies innerhalb des Lyme-Borreliose-Komplexes erfolgt durch Analyse phänotypischer Merkmale (Serotypisierung, Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)) (BOERLIN et al., 1992; WILSKE et al., 1993; WILSKE et al., 1995; WANG et al., 1999) oder durch genetische Typisierung (BELFAIZA et al., 1993; POSTIC et al., 1994; STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; XU & JOHNSON, 1995; POSTIC et al., 1996; LE FLECHE et al., 1997; WANG et al., 1999). Der Lyme-Borreliose-Komplex beinhaltet aktuell 18 Genospezies (Tab. 1) (MARGOS et al., 2011).

Tab. 1: 18 vorgeschlagene (p) und bestätigte (c) Spezies innerhalb des Lyme-Borreliose-Komplexes und deren Verbreitung (*B.* = *Borrelia*)

Spezies	Verbreitung
<i>B. afzelii</i> (c)	Europa, Asien
<i>B. americana</i> (p)	Nordamerika
<i>B. andersonii</i> (c)	Nordamerika
<i>B. bavariensis</i> (p)	Europa, Asien (?)
<i>B. bissettii</i> (c)	Nordamerika, Europa
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (c)	Nordamerika, Europa
<i>B. californiensis</i> (c)	Westen der USA
<i>B. carolinensis</i> (c)	Südosten der USA
<i>B. garinii</i> (c)	Europa, Asien
<i>B. japonica</i> (c)	Japan
<i>B. kurtenbachii</i> (p)	Nordamerika, (Europa?)
<i>B. lusitaniae</i> (c)	Mittelmeerraum
<i>B. sinica</i> (c)	China
<i>B. spielmanii</i> (c)	Europa
<i>B. tanukii</i> (c)	Japan
<i>B. turdi</i> (c)	Japan
<i>B. valaisiana</i> (c)	Europa, Japan
<i>B. yangtze</i> (c)	China
<i>Genomospecies2</i>	USA

In Nordamerika ist die einzige humanpathogene Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto (ss). Diese Spezies verursachen auch Infektionen beim Hund (APPEL, 1990; STEERE, 2001). In Europa hingegen sind mindestens fünf Spezies bekannt, die Erkrankungen beim Menschen hervorrufen können (*B. burgdorferi* ss, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*) (WILSKE, 2003). Auch *B. bissettii*, *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* werden bei Patienten in Europa oft isoliert; ihre tatsächliche Rolle als relevante Pathogene ist jedoch noch fraglich (STANEK et al., 2012). *B. afzelii* und *B. garinii* werden auch bei Hunden in Europa isoliert. Ob diese Infektionen tatsächlich Krankheiten beim Hund verursachen, konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt anhand von experimentellen Studien nicht nachgewiesen werden (HOVIUS et al., 1999; SPECK et al., 2001; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

1.2. Morphologie

Borrelien sind einzellige, spiralförmige, motile Bakterien (Abb. 1); ihre Größe variiert zwischen 10 - 30 x 0,18 - 0,25 µm (BURGDORFER et al., 1982; MARQUES, 2010). Die Zellwand besteht aus einer zytoplasmatischen Membran, die einen die Zellorganellen enthaltenden protoplasmatischen Zylinder umschließt. Diese Lipid-Doppelschicht ist von Peptidoglycanen und sieben bis elf periplasmatischen Endoflagellen umgeben, die durch Formveränderungen für die Motilität der Organismen verantwortlich sind. Die Endoflagellen werden von einer locker verbundenen äußeren Membran umhüllt. Auf dieser befindet sich eine muköse Schicht, deren exakte Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist. Vermutlich dient sie dem Schutz der Bakterienzelle vor äußeren Einflüssen (CHARON & GOLDSTEIN, 2002).

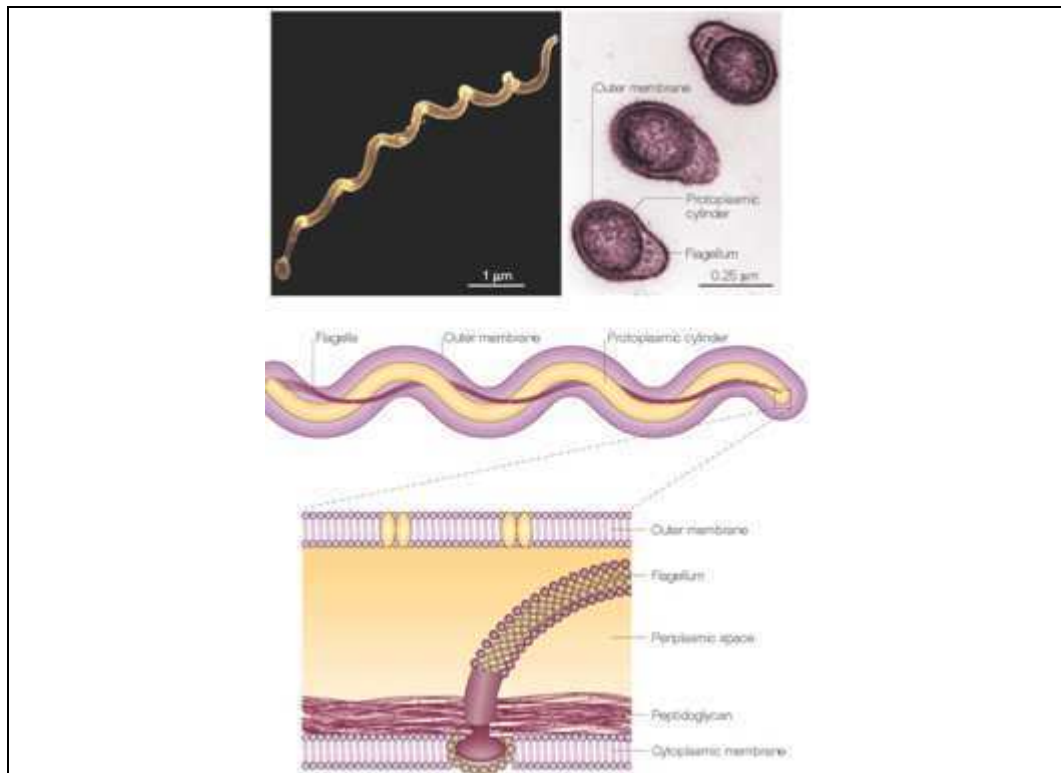


Abb. 1: Struktur der Borrelien (ROSA et al., 2005)

Die Fähigkeit zur Persistenz im Wirtsorganismus ist ein entscheidendes Charakteristikum der Borrelien. Die Persistenz wird durch vielfältige biologische Besonderheiten des Erregers ermöglicht. Damit unterscheiden sie sich grundsätzlich von anderen Bakterien. So ist eine wichtige Eigenschaft von *B. burgdorferi* die Unabhängigkeit von Eisen beim Wachstum (POSEY & GHERARDINI, 2000). Für den Wirtsorganismus kann die Einschränkung der Eisenverfügbarkeit eine mögliche Abwehrstrategie sein. Da Borrelien nicht von Eisen abhängig sind, umgehen sie diese Form der Wirtsabwehr. Eine weitere Strategie zur Persistenz des Erregers ist die Fähigkeit zu morphologischen Veränderungen, die als Reaktion auf ungünstige Umgebungsfaktoren initiiert werden können (KERSTEN et al., 1995). So kann sich der Organismus in zystische, besser überlebensfähige Formen transformieren (Sphäroblasten, L-Formen, blebs) (SKOTARCZAK, 2009). Die straff gewundenen Sphäroblasten sind unbeweglich und gegen nahezu jedes Antibiotikum resistent (ALBAN et al., 2000). Die zellwandlosen L-Formen sind ebenfalls gegen viele Antibiotika resistent, die gegen die Zellwand der Erreger gerichtet sind. Diese sehr widerstandsfähigen Erscheinungsformen der Borrelien sind ein Grund für das lange Überleben des Erregers im Organismus (MURSIC et al., 1996). Bei Verbesserung der Bedingungen findet eine Retransformation in die ursprüngliche,

motile Form statt (BRORSON & BRORSON, 1997; GRUNTAR et al., 2001; MURGIA & CINCO, 2004). Desweiteren kann sich *B. burgdorferi* sl in Falten zellulärer Membranen verstecken und sich so dem Zugriff des Immunsystems oder der Zerstörung durch Antibiotika entziehen (GIRSCHICK et al., 1996).

Borrelien bilden keine Toxine (STEERE, 2006). Sie exprimieren nur wenige Proteine mit biosynthetischer Aktivität und haben daher nur einen sehr rudimentären eigenen Metabolismus. Somit sind Borrelien bei der Verstoffwechselung von Fetten, Kohlenhydraten, Proteinen und Aminosäuren auf den Wirtsorganismus angewiesen (FRASER et al., 1997).

1.3. Vektor *Ixodes* spezieis

B. burgdorferi sl wird von Zecken des *Ixodes*-(*I.*)-*ricinus*-Komplex (Ordnung: *Acarii*, Unterordnung: *Parasitiformes*, Überfamilie: *Ixodida*, Familie: *Ixodidae*, Gattung: *Ixodes*) übertragen (FUKUNAGA et al., 2000). Dieser Komplex umfasst *I. ricinus* in Europa, *I. persulcatus* in Asien sowie *I. pacificus* im Westen und *I. scapularis* im Nordosten sowie im Mittleren Westen der USA (JAENSON, 1991; OLIVER, 1996; FALCO et al., 1999; QIU et al., 2002; HULINSKA et al., 2007; STANEK et al., 2012).

Der zweigliedrige Körper der Zecke ist dunkel gefärbt und zeigt u-förmige Kerben vor dem Anus (Abb. 2). Die Mundpartie ist nach außen gerichtet. Das dorsale Körperareal der männlichen adulten Tiere ist vollständig von einem harten Schild (Scutum) bedeckt; beim weiblichen Tier bedeckt das Scutum nur unvollständig und in Kopfnähe den Rücken (JAENSON, 1991; LITTMAN, 2003). *Ixodes* spp. haben einen zweijährigen Lebenszyklus und durchlaufen darin vier Entwicklungsstadien, vom Ei über das Larven- und Nymphenstadium bis hin zur adulten Zecke (MARQUES, 2010).



Abb. 2: Männliche und weibliche Zecken in den drei Entwicklungsstadien Larve, Nymphe und Adulte (WWW.MEGEDI.COM, 2011)

1.3.1. Verbreitung und Infektionsraten von *Ixodes* spezie

Die Prävalenz von *Borrelia*-Infektionen bei Zecken variiert abhängig von der geographischen Region und vom Entwicklungsstadium der Vektoren (CINCO et al., 1997; HILDEBRANDT et al., 2003; RAUTER & HARTUNG, 2005; MILUTINOVIC et al., 2008; COTTE et al., 2009; REYE et al., 2010). Für Infektionen bei *Ixodes* spp. sind in Europa am häufigsten die Borrelien-Spezies *B. afzelii* und *B. garinii* verantwortlich, gefolgt von *B. valaisiana* und *B. burgdorferi* ss (RAUTER & HARTUNG, 2005).

Die durchschnittliche Prävalenz von Infektionen bei Zecken innerhalb Europas wird mit 13,7 % angegeben. So waren 15 423 von 112 579 Zecken in einer europaweiten Studie mit Borrelien infiziert, wobei adulte Zecken signifikant häufiger infiziert waren als Nymphen (RAUTER & HARTUNG, 2005). Von West- zu Osteuropa besteht eine Tendenz zu zunehmenden Infektionsraten adulter Zecken. Dabei sind die höchsten Infektionsraten in Mitteleuropa vorhanden (Österreich, Tschechien, Süddeutschland, Schweiz, Slovenien) (RAUTER & HARTUNG, 2005). Innerhalb Deutschlands gelten 4,7 % bis 36,2 % der Zecken als infiziert (Tab. 2) (GRAY et al., 1998; RAUTER & HARTUNG, 2005). Die höchste genannte Prävalenz von 36,2 % wurde im Süden Deutschlands gefunden (BAUMGARTEN et al., 1999; FINGERLE et al., 1999).

Tab. 2: Prävalenz von Infektionen bei Zecken innerhalb Deutschlands (BSK = in Barbour-Stoenner-Kelly-Medium kultiviert; DFM = Dunkelfeldmikroskopie; IFA = Immunfluoreszenztest; PCR = Polymerase-Kettenreaktion; k. A. = keine Angabe)

Jahr	Methode(n)	Infektionsrate (%)	Anzahl Zecken		
			Gesamt	Nymphen	Adulte
1985 – 1986	IFA	14,6	2369	1157	1212
1994	IFA	19,1	472	157	315
1997	PCR	36,2	492	91	401
1999 – 2000	PCR	35,2	1055	507	548
1992 – 1993	DFM	10,4	279	68	211
1992 – 1992	DFM	4,7	1185	1185	k. A.
1992 – 1993	BSK	8,4	598	485	113
1992 – 1993	IFA	12,4	194	147	47
1991	IFA	18,4	414	414	k. A.
1992	DFM	16	100	k. A.	100
1993	BSK	18	100	k. A.	100
1994	PCR	22	100	k. A.	100
1996	PCR	9,0	3926	3520	406
NG	PCR	18,1	226	k. A.	226
1987 – 1988	IFA	6,3	1954	1954	k. A.
1998 – 2000	PCR	15,8	3138	NG	NG
1999 – 2000	PCR	11,1	305	243	62
1986	BSK	5,8	173	49	124
1994	PCR	9,0	112	112	k. A.
NG	PCR	31,5	165	NG	NG
1993 – 1994	BSK	16,3	559	k. A.	559
1991	DFM, IFA	17,9	756	531	225

1.3.2. Exposition und Übertragung

Borrelien unterhalten einen hocheffizienten enzootischen Zyklus, der Zecken des *I. ricinus*-Komplexes und eine große Anzahl verschiedener Tiere als Wirtsorganismen beinhaltet (STEERE et al., 2004). *Ixodes* spp. haben einen zweijährigen Lebenszyklus, in dem vier Entwicklungsstadien durchlaufen werden: Ei, Larve, Nymphe und Adulte (MARQUES, 2010). In jedem Entwicklungsstadium erfolgt eine Blutmahlzeit. Darauf folgt das Abfallen der Zecke und ihre Weiterentwicklung in der Umgebung (PATRICAN, 1997). Immature Stadien bleiben für zwei bis vier Tage, adulte Stadien für fünf bis sieben Tage am Wirt haften (FRITZ & KJEMTRUP, 2003).

B. burgdorferi wird transstadiell von Larven auf Nymphen und von Nymphen auf Adulte übertragen. Zecken, die als Larven oder Nymphen mit *B. burgdorferi* infiziert wurden, können also den Erreger als Nymphen oder Adulte bei folgenden Blutmahlzeiten im Frühjahr oder Sommer auf den Wirtsorganismus übertragen (STAFFORD et al., 1998). Eine transovarielle Übertragung von Borrelien erfolgt nicht (SCHOELER & LANE, 1993). Die Spirochäten befinden sich vor der Blutmahlzeit meist im Mitteldarm der Zecke und gelangen erst während des Saugaktes in die Speicheldrüsen, um von dort aus übertragen zu werden (GERN et al., 1996). Die Übertragung der Borrelien findet daher nicht gleich zu Beginn des Saugaktes statt. Zahlreiche Studien mit infizierten *I. scapularis* weisen eine effiziente Übertragung der Organismen erst nach mindestens 48 Stunden Adhärenz am Wirt nach. Die Effizienz der Übertragung steigt mit Dauer des Saugaktes an (DES VIGNES et al., 2001; OHNISHI et al., 2001). Allerdings wurden auch vereinzelt mit Spirochäten infizierte Speicheldrüsen von Zecken gefunden (LEUBA-GARCIA et al., 1994). So könnte es bereits zu früheren Übertragungen kommen. Es existieren einzelne Berichte über erfolgreiche Übertragung nach bereits 17 Stunden Saugzeit (KAHL et al., 1998). Auch scheint die Borrelien-Spezies, mit der die Vektoren infiziert sind, die Geschwindigkeit der Übertragung zu beeinflussen. So überträgt *I. ricinus* *B. afzelii* schneller als *B. burgdorferi* (CRIPPA et al., 2002).

Als Wirte für immature Zeckenstadien dienen kleine Nagetiere, Eidechsen und bodennah lebende Vögel. Adulte Zecken nutzen meist größere Säugetiere zur Blutmahlzeit, darunter auch Mensch und Hund. Welche von über 300 Wirbeltierarten von *I. ricinus* in Europa bevorzugt frequentiert werden, ist nach

wie vor nicht genau bekannt (PIESMAN & GERN, 2004). Als Reservoir für Borrelien in Deutschland gelten der Siebenschläfer (*Glis glis*) und der Gartenschläfer (*Eliomys quercinus*) als gesichert (MATUSCHKA et al., 1994; MATUSCHKA et al., 1999). Generell gilt *B. afzelii* eher als nagerassoziiert (auch *B. burgdorferi* ss und *B. garinii* Serotype Osp A 4), während andere *B. garinii*-Serotypen häufiger bei Vögeln anzutreffen sind (KURTENBACH et al., 2002).

1.4. Epidemiologie beim Hund

Die Infektionsraten beim Hund zeigen deutliche regionale Unterschiede (Tab. 3). Eine aktuelle deutschlandweite Antikörper-Studie ermittelte eine durchschnittliche Antikörperprävalenz von 9,7 % in Deutschland. In dieser Studie war Westdeutschland die Region mit höchster Prävalenz (10,3 %). Neun Prozent der Hunde in Südwestdeutschland und 5,8 % der Hunde in Norddeutschland haben Antikörper gegen *B. burgdorferi* sl (KRUPKA et al., 2007). Geringere Prävalenzen waren im Nordosten (1,9 %) und im Südosten (3,4 %) Deutschlands vorhanden (KRUPKA et al., 2007). Hunde haben häufiger Antikörper, je öfter und länger sie sich im Freien aufhalten und je mehr sie Kontakt mit Zecken haben (GUERRA et al., 2001; LITTMAN, 2003). Desweiteren unterscheiden sich die Antikörperprävalenzen abhängig vom Gesundheitszustand der untersuchten Hunde sowie von der jeweils angewandten diagnostischen Methode. Ebenfalls beeinflusst die Jahreszeit, in der Untersuchungen auf das Vorliegen von Infektionen durchgeführt werden, die Resultate. Bei der humanen Lyme-Borreliose treten die meisten Infektionen zwischen Mai und August auf. Dies spiegelt die in diesen Monaten höchste Aktivität der Vektoren wider (MARQUES, 2010).

Tab. 3: Antikörperprävalenzen bei Hunden in verschiedenen Regionen Europas (ELISA = enzyme-linked immunosorbant assay)

Region	Jahr	Methode	Infektionsrate (%)	Referenz
Deutschland	2008	C ₆ -ELISA (SNAP [®] 4Dx [®])	9,7	(STRAUBINGER et al., 2008)
Deutschland	1991	IFA	35,5	(WEBER et al., 1991)
Deutschland	2005	IFA	95	(SUM & HARTMANN, 2005)
Schweden	2007	IFA	8,6	(JADERLUND et al., 2007)
Frankreich	2009	C ₆ -ELISA (SNAP [®] 4Dx [®])	1,0	(PANTCHEV et al., 2009)

1.5. Verlauf der Infektion

Nachdem eine Infektion mit Borrelien stattgefunden hat, werden Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert. Granulozyten und Makrophagen wandern zu dem Ort, an dem der Zeckenbiss und die Inokulation des Erregers stattgefunden haben (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Diese Zellen versuchen, die Bakterien mittels Phagozytose zu eliminieren (MONTGOMERY et al., 1994). Zudem werden einige Tage nach der Infektion Sauerstoffradikale freigesetzt, die den Erreger extrazellulär angreifen sollen. Diese Reaktion des Immunsystems ist allerdings lokal begrenzt und kann die Infektion nicht vollständig eliminieren. Manchmal kann sich die Infektion weiter ausbreiten und systemische Entzündungsreaktionen hervorrufen. Beim Menschen ist die initiale lokale Entzündungsreaktion durch das *Erythema migrans* sichtbar (STANEK et al., 2012).

Im Vergleich zu anderen Bakterien kommt es nach einer Infektion mit Borrelien erst spät zur Ausbildung von Antikörpern. Bei experimentell infizierten Hunden konnten Antikörper frühestens drei Wochen nach Infektion nachgewiesen werden (LIANG et al., 2000b). Immunglobulin M (IgM) Antikörper werden nach zwei bis vier Wochen gebildet. Antikörper der Immunglobulinklasse G (IgG) werden erst nach vier bis sechs Wochen gebildet (CRAFT et al., 1984). Die Unterscheidung der beiden Immunglobulinklassen IgM und IgG ist jedoch beim Hund nicht hilfreich, da zum Zeitpunkt des Auftretens klinischer Symptome in der Regel bereits IgG-Antikörper vorhanden sind. Zudem werden im Falle einer chronischen

Infektion häufig erneut IgM-Antikörper gebildet, sodass beim Vorliegen von IgM-Antikörpern nicht notwendigerweise eine frische Infektion vorhanden sein muss. Ganz im Gegenteil können Antikörper gegen Borrelien über einen sehr langen Zeitraum nachweisbar sein, teilweise sogar lebenslang (MAGNARELLI et al., 1990; APPEL et al., 1993; STRAUBINGER et al., 1997; KALISH et al., 2001; TOEPFER & STRAUBINGER, 2007; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010; STANEK et al., 2012). Vermutlich kann die Infektion bei einem einmal infizierten Hund weder mit Hilfe des angeborenen noch des erworbenen Immunsystems vollständig eliminiert werden (STANEK et al., 2012). Die Persistenz des Erregers und die damit verbundenen proinflammatorischen Aktivitäten des Immunsystems sind an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

1.6. Symptome der Lyme-Borreliose

Die Häufigkeit einer klinisch manifesten Lyme-Borreliose unterscheidet sich bei Mensch und Hund deutlich. Während über 95 % der Hunde nach einer Infektion keinerlei Symptome entwickeln, führt die Infektion beim Menschen wesentlich wahrscheinlicher zur Ausprägung einer klinisch relevanten Erkrankung. Nur etwa 10 % der infizierten Menschen bleiben asymptomatisch (FRITZ & KJEMTRUP, 2003; LITTMAN, 2003). Somit stellt die Lyme-Borreliose in Europa und Nordamerika die häufigste vektorübertragene Infektionskrankheit beim Menschen dar (O'CONNELL et al., 1998; WANG et al., 1999). Die klinischen Manifestationsformen der europäischen humanen Lyme-Borreliose sind im Vergleich zu denen in Nordamerika aufgrund der Vielzahl an pathogenen *Borrelia*-Spezies sehr variabel (PIESMAN & GERN, 2004; STANEK et al., 2012).

1.6.1. Symptome beim Mensch

Die Lyme-Borreliose beim Mensch wird klinisch in ein frühes lokales, in ein frühes disseminiertes und ein spätes Krankheitsstadium unterteilt. Die frühe lokalisierte Form zeigt sich durch das Auftreten der charakteristischen Hautläsion, dem *Erythema migrans*. In der frühen disseminierten Form treten zwei oder mehrere *Erythema-migrans*-Hautläsionen auf und es kann zur Ausprägung einer Neuroborreliose oder Lyme-Myokarditis kommen. Die späte Phase der Lyme-Borreliose manifestiert sich durch das Auftreten von Arthritiden. Zudem kann es

in dieser Phase zu Hautmanifestationen wie der *Acrodermatitis chronica atrophicans* kommen, selten auch zu neurologischen Symptomen. Die Unterscheidung in diese Stadien ist allerdings eher theoretisch, da sie nicht immer der tatsächlichen klinischen Manifestation entspricht (WORMSER et al., 2006; STANEK et al., 2012).

1.6.1.1. Symptome nach Infektion mit *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

Erstes charakteristisches Symptom einer Lyme-Borreliose ist eine Macula oder Papel an der Einstichstelle der Zecke, die sich zu einer großen, kreisförmigen Hautläsion mit zentraler Aufhellung ausbreitet (*Erythema migrans*). Dieses Symptom tritt drei bis 23 Tage nach dem Zeckenbiss auf (STEERE, 2001). Zum Zeitpunkt des Auftretens des *Erythema migrans* ist die Infektion noch lokalisiert. Allerdings zeigen 10 % der Patienten mit Lyme-Borreliose diese klassische Hautläsion nicht (MARQUES, 2010).

Auf dieses Stadium folgt die frühe disseminierte Form (PIESMAN & GERN, 2004). Diese ist durch das Auftreten weiterer Hautläsionen an anderen Stellen als die der ursprünglichen Läsion charakterisiert. In dieser Krankheitsphase treten unspezifische Symptome wie Schwäche, Unwohlsein, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Fieber auf. Etwa 5 % der nichtbehandelten Patienten entwickeln kardiale Symptome im Sinne eines atrioventrikulären Blocks (STEERE, 2001). Neurologische Symptome treten bei 15 bis 20 % der unbehandelten Patienten auf. Diese können sich als bilaterale Facialisparesie, Meningitis, motorische oder sensorische Radiculoneuropathie oder Myelitis manifestieren (PIESMAN & GERN, 2004).

Die Hauptmanifestation der späten Infektion ist die Lyme-Arthritis als Mono- oder Oligoarthritis. Annähernd 60 % der Patienten haben kurze Attacken von Gelenksschwellung (Synovitis) mit Gelenkschmerzen. Neurologische Manifestationen der späten Lyme-Borreliose sind selten (FRITZ & KJEMTRUP, 2003). In einer europäischen Fallstudie hatte keiner der dokumentierten Patienten neurologische Symptome, die einer späten Lyme-Borreliose zuzuordnen waren (HUPPERTZ et al., 1999). Neurologische Erkrankungen der späten Lyme-Borreliose können sich als milde Enzephalopathie oder chronische milde axonale Polyneuropathie mit distalen Parästhesien und Schmerzen der Nervenwurzel äußern (HALPERIN et al., 1990; HALPERIN et al., 1991).

Das „Post-Lyme-Syndrom“ beschreibt das intermittierende Auftreten von unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Schlafstörungen, Gedächtnis- und Konzentrationsstörungen sowie Muskel- und Gelenkschmerzen bei Patienten mit adäquat antibiotisch behandelter Lyme-Borreliose. Die Ursache für dieses Syndrom ist nicht abschließend bekannt, es scheint sich um eine multifaktorielle Genese zu handeln (FRITZ & KJEMTRUP, 2003; STEERE et al., 2004; MARQUES, 2010; STANEK et al., 2012). Trotz intensiver Untersuchungen konnte bisher nicht eindeutig belegt werden, dass dieses Syndrom aus einer persistierenden *Borrelia*-Infektion resultiert. Es wird angenommen, dass mögliche andere Parallelerkrankungen, ein „Postinfective-fatigue-Syndrom“ sowie ein späteres Ansprechen auf Therapie bei Patienten mit später Lyme-Borreliose eine Rolle spielen (MARQUES, 2008).

1.6.1.2. Symptome nach Infektion mit anderen *Borrelia*-Spezies

Anhand vieler Untersuchungen wird angenommen, dass ein Zusammenhang zwischen verschiedenen *Borrelia*-Spezies und klinischen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose beim Menschen existiert (PIESMAN & GERN, 2004). Da innerhalb Europas eine größere Diversität der pathogenen *Borrelia*-Spezies besteht, sind auch die klinischen Symptome bei europäischen Patienten im Vergleich zu Patienten aus Nordamerika sehr vielfältig. *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* und *B. afzelii* scheinen unterschiedliche Organotropismen zu haben (PICKEN et al., 1998; JAULHAC et al., 2000).

So wird *B. afzelii* insbesondere aus menschlichen Hautläsionen isoliert und im Zusammenhang mit Hautmanifestationen der Lyme-Borreliose in Verbindung gebracht (WILSKE et al., 1993; PIESMAN & GERN, 2004). Diese sind die *Acrodermatitis chronica atrophicans* oder das seltene *Borrelia*-assoziierte Lymphozytom. Letzteres zeigt sich als schmerzlose, bläulich-rote, verhärtete noduläre Läsion, die bisher fast ausschließlich bei europäischen Patienten beobachtet wurde. In einer Studie zu klinischen Manifestationsformen bei europäischen Patienten war 1 % der Patienten von *Acrodermatitis chronica atrophicans* betroffen. 2 % zeigten das *Borrelia*-assoziierte Lymphozytom (HUPPERTZ et al., 1999).

B. garinii wird häufig aus Liquorproben isoliert. Daher wird diese Spezies insbesondere mit neurologischen Symptomen der Lyme-Borreliose assoziiert,

darunter Fazialisparese, Meningitis und periphere Radikuloneuropathie (WILSKE et al., 1996).

Allerdings sind die Unterschiede innerhalb der pathogenen Spezies *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* und *B. garinii* nicht allein verantwortlich für unterschiedliche Manifestationsformen und Symptome der Lyme-Borreliose. So zeigen aktuelle Untersuchungen, dass nur einige wenige Gruppen innerhalb der pathogenen Spezies die frühe disseminierte und späte Krankheitsform auslösen (SEINOST et al., 1999; BARANTON et al., 2001). Innerhalb der drei pathogenen Spezies *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* und *B. garinii* wurden 58 unterschiedliche Osp C (Outer surface-protein C)-Gruppen identifiziert. In Isolaten von Patienten mit früher disseminierter oder später Form der Lyme-Borreliose wurden aber nur zehn dieser Gruppen identifiziert. Offenbar ist also das Osp C für die Invasivität der Borrelien verantwortlich und damit auch für unterschiedliche klinische Manifestationsformen (PIESMAN & GERN, 2004).

1.6.2. Symptome beim Hund

Klinische Symptome sind relativ gut nach experimenteller Infektion charakterisiert. Bei Feldinfektionen entwickeln über 95 % der Hunde keinerlei klinische Symptome (LITTMAN, 2003). Zudem ist es schwierig zu beurteilen, ob Symptome, die zu einer klinisch relevanten Lyme-Borreliose passen könnten, tatsächlich ihre Ursache in der Infektion mit Borrelien haben, die bei sehr vielen Hunden vorkommt und in aller Regel nicht zu Symptomen führt (LITTMAN et al., 2006).

1.6.2.1. Experimentelle Infektionen

Einige Studien beschreiben die experimentelle Infektion von Hunden mit Borrelien sowie die klinischen und labordiagnostischen Veränderungen der experimentell infizierten Hunde (APPEL et al., 1993; STRAUBINGER et al., 1998; CALLISTER et al., 2000).

1.6.2.1.1. Experimentelle Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

In einer Studie wurden junge Beagles im Alter von sechs bis zwölf Wochen experimentell infiziert. Die Infektion wurde durch das Anheften von infizierten Zecken induziert. Nach einer mittleren Inkubationszeit von 68 Tagen wurden selbstlimitierende, wenige Tage anhaltende klinische Symptome wie Anorexie,

Fieber, lokale Lymphadenopathie sowie Lahmheit mit vermehrt gefüllten Gelenken im Sinne einer akuten Arthritis (Mono-, Polyarthritis) beobachtet. Histologisch wurde eine neutrophile Entzündung der Gelenke nachgewiesen. Es waren die Gelenke betroffen, die am nächsten zu den Anheftungsstellen der Zecken lokalisiert waren. Einige dieser Hunde zeigten nach zwei bis vier Wochen erneut klinische Symptome, die aber ebenfalls ohne Therapie selbstlimitierend waren (STRAUBINGER et al., 1998). In einer Studie mit zwölf bis 26 Wochen alten Beagles entwickelten 77 % der Tiere intermittierende Lahmheiten über einen kurzen Zeitraum von ein bis zwei Tagen. Ein Wiederaufflammen der klinischen Symptome wurde bei diesen Tieren nicht beobachtet (CALLISTER et al., 2000). Eine weitere Studie zeigte ebenfalls, dass jüngere Welpen eher eine Infektion mit deutlicherer klinischer Relevanz entwickeln als ältere Tiere (APPEL et al., 1993).

Das *Erythema migrans* als Leitsymptom einer frühen, lokalisierten humanen Lyme-Borreliose tritt beim Hund nicht auf. Treten beim Hund Hautveränderungen an der direkten Einstichstelle auf, sind das eher lokale Entzündungsreaktion in Folge des Zeckenbisses. Labordiagnostisch zeigen sich keine charakteristischen Veränderungen bei experimentell infizierten Hunden (LITTMAN, 2003).

1.6.2.1.2. Experimentelle Infektionen mit anderen *Borrelia*-Spezies

Bis zum heutigen Zeitpunkt existieren noch keine Studien mit Hunden, die mit anderen *Borrelia*-Spezies wie *B. afzelii* oder *B. garinii* experimentell infiziert wurden. Es gelang bisher nicht, nach experimentellen Infektionen Symptome bei Hunden auszulösen. Daher kann über die Ausprägung von klinischen Symptomen nach Infektionen mit diesen Spezies noch keine Aussage getroffen werden (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

1.6.2.2. Feldinfektionen

Ein großer Teil der im Feld infizierten Hunde entwickeln keinerlei klinische Symptome einer Lyme-Borreliose (LITTMAN, 2003; LITTMAN et al., 2006; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Bis zum jetzigen Zeitpunkt existieren zudem keine verlässlichen Daten, wie viele Tiere tatsächlich von einer klinisch manifesten Borreliose betroffen sind, da viele Hunde Antikörper haben, damit aber nicht bewiesen ist, dass eine entsprechende Symptomatik tatsächlich durch die *Borrelia*-Infektion oder aber durch andere Erkrankungen hervorgerufen wird. Eine Einteilung in die drei klassischen Krankheitsstadien wie bei der Lyme-

Borreliose des Menschen kann beim Hund nicht vorgenommen werden. In den meisten Fällen kann auch der Zeitpunkt der Infektion nicht genau genannt werden, da Zecken am Hund häufig übersehen werden (LITTMAN, 2003; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

Beschrieben ist, dass in den ersten Tagen und Wochen einer Infektion unspezifische Symptome wie Fieber, reduziertes Allgemeinbefinden und lokale Lymphknotenschwellung auftreten können. Diese Symptome sind in der Regel selbstlimitierend und werden vom Besitzer oft nicht wahrgenommen. (LITTMAN, 2003; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

Wochen bis Monate nach einer Infektion können Symptome des Bewegungsapparates wie intermittierende oder chronische Lahmheiten, die wechselnd andere Gelenke betreffen können, auftreten. Diese Symptome des Bewegungsapparates können auch von erneutem reduziertem Allgemeinbefinden und erhöhter Körpertemperatur begleitet werden (LITTMAN, 2003; LITTMAN et al., 2006). Eine Studie aus den USA beobachtete über 20 Monate initial klinisch unauffällige Hunde (n = 234) hinsichtlich der Entwicklung von Symptomen des Bewegungsapparates. Eine Gruppe hatte Antikörper gegen *B. burgdorferi* (n = 125), die andere Gruppe hatte keine Antikörper gegen Borrelien (n = 109). In beiden Gruppen entwickelten jeweils etwa 5 % der Hunde Symptome des Bewegungsapparates, die von reduziertem Allgemeinbefinden und erhöhter Körpertemperatur begleitet waren. Der Unterschied zwischen Tieren mit und ohne Antikörper war statistisch nicht signifikant (LEVY & MAGNARELLI, 1992). In einer Studie wurde bei Hunden mit Arthropathien signifikant häufiger DNA verschiedener Bakterien, unter anderem auch die von *B. burgdorferi* aus erkrankten Gelenken isoliert. Es wird daher angenommen, dass bei den Hunden dieser Studienpopulation die Anwesenheit unterschiedlicher bakterieller DNA ein wichtiger Faktor in der Pathogenese entzündlicher Arthritiden ist (MUIR et al., 2007). Eine Ruptur des Kreuzbandes ist jedoch generell eine wichtige Differentialdiagnose für intermittierende Lahmheiten (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

Ein als „Lyme-Nephropathie“ bezeichnetes Krankheitsbild wird mit der Existenz von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* in Verbindung gebracht (LITTMAN, 2003; LITTMAN et al., 2006). Eine Studie in USA untersuchte 49 Hunde mit fatalem Verlauf einer Glomerulopathie auf einen möglichen Zusammenhang mit

einer *Borrelia*-Infektion. Die Tiere entwickelten Symptome einer Glomerulonephritis und sekundäre Tubulusschäden, Ödeme, Ergüsse, Hypertension und thromboembolische Geschehen. Histologisch konnten Läsionen im Sinne einer immun-medierten Glomerulonephritis, diffusen tubulären Nekrose mit Regeneration und lymphoplasmazellulären interstitiellen Nephritis nachgewiesen werden. Zwar konnten bei allen Hunden, die auf das Vorliegen von Antikörpern getestet wurden, spezifische Antikörper gegen *B. burgdorferi* nachgewiesen werden (n = 18), der Nachweis lebender Borrelien aus dem Nierengewebe der betroffenen Hunde gelang aber nicht. In dieser amerikanischen Studie waren Labrador Retriever und Golden Retriever überrepräsentiert (DAMBACH et al., 1997). In Europa ist ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Glomerulonephritis bei Berner Sennenhunden und dem Vorliegen von Antikörpern gegen *Borrelia*-Spezies beschrieben. Vermutlich ist die „Lyme-Nephropathie“ ein immun-mediertes Geschehen und abhängig von dem betreffenden Borrelien-Stamm, genetischer Prädisposition (z. B. Berner Sennenhunde, Labrador Retrievers, Golden Retrievers, Shetland Sheepdogs) und anderen eventuellen Triggern (DAMBACH et al., 1997; LITTMAN, 2003; LITTMAN et al., 2006; GERBER et al., 2007).

Weiterhin existieren einzelne Berichte über neurologische Symptome, die mit einer *Borrelia*-spp.-Infektion assoziiert wurden. In diesen Berichten wurde die Diagnose allerdings nur anhand von Antikörperuntersuchungen bei Hunden mit neurologischen Symptomen gestellt (FEDER et al., 1991; MANDEL et al., 1993). Eine aktuelle Studie untersuchte 54 Hunde mit neurologischen Symptomen. Bei diesen Hunden wurde nicht nur das Vorliegen von Antikörpern im peripheren Blut, sondern auch das Vorliegen von Antikörpern und DNA im Liquor untersucht. Es konnten bei keinem der Tiere Antikörper gegen Borrelien oder Borrelien-DNA in der Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass es nicht wahrscheinlich ist, dass Borrelien neurologische Symptome beim Hund hervorrufen (JADERLUND et al., 2009).

Es gibt einen Fallbericht über eine kardiale Manifestation einer *Borrelia*-Infektion. Dieser Hund hatte eine Myokarditis mit atrioventrikulärem Block. Aber auch hier wurden nur Antikörper gegen *B. burgdorferi* nachgewiesen. Im kardialen Gewebe des Hundes gelang der Nachweis des Erregers ebenfalls nicht (LEVY & DURAY, 1988).

1.7. Diagnostik

Zum Nachweis von Borrelien stehen sowohl direkte wie auch indirekte Nachweismethoden zur Verfügung (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005).

1.7.1. Direkte Nachweismethoden

Zu den direkten Nachweismethoden zählen die Kultivierung sowie die Detektion erregerspezifischer DNA. Sowohl die Kultivierung des Erregers wie auch der Nachweis von *Borrelia*-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sind nur im positiven Fall beweisend (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005).

1.7.1.1. Kultivierung von *Borrelia burgdorferi*

Die Kultivierung von *B. burgdorferi* kann aus verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten erfolgen, darunter Haut, Bindegewebe, Synovia, Cerebrospinalflüssigkeit, sowie aus Blut, Urin, Herzmuskel und Irisgewebe (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). Gängiges Medium zur Kultivierung ist das Barbour-Stoener-Kelly II Medium (BSK II). Die Kultivierung von *B. burgdorferi* als diagnostischer Test in der klinischen Praxis ist aufgrund der benötigten langen Inkubationszeit, des hohen Arbeitsaufwandes und der geringen Sensitivität, vor allem bei Patienten mit extrakutanen Manifestationsformen, nicht geeignet (WILSKE, 2003; AGUERO-ROSENFELD et al., 2005; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Die Sensitivität dieser Methode liegt zwischen 10 % und 70 %, je nachdem, welche Gewebe oder Körperflüssigkeiten untersucht werden. Am besten geeignet sind Hautbiopsien mit einer Sensitivität von 50 – 70 % (WILSKE, 2003). Insbesondere aus Blut ist die Kultivierung von Borrelien schwierig, da die Menge an Erregern im peripheren Blut in der Regel sehr gering ist (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Bei europäischen Patienten konnte der Erreger bei weniger als 10 % aus Blutproben kultiviert werden (ARNEZ et al., 2001; MARASPIN et al., 2001). Desweiteren ist die Kultivierung nur bei unbehandelten Patienten hilfreich, da der Nachweis des Erregers in der Kultur selbst nach Kurzzeitbehandlung mit Antibiotika nicht mehr möglich ist (NADELMAN et al., 1993).

1.7.1.2. Polymerase-Kettenreaktion

Der direkte Nachweis von Borrelien-DNA aus beispielsweise Haut, Blut, Urin, Synovia oder Cerebrospinalflüssigkeit ist für die klinische Praxis ebenfalls nur von geringer Bedeutung (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005; KRUPKA &

STRAUBINGER, 2010). Sensitivität und Spezifität der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unterscheiden sich teils deutlich, je nach untersuchten Geweben oder Körperflüssigkeiten. Bei Menschen in Europa mit *Erythema migrans* wird die Sensitivität der PCR mit durchschnittlich 73 % angegeben; die Spezifität liegt bei 100 %. Bei der Untersuchung von Blutproben liegt die Sensitivität nur bei 10 %. Bei der Untersuchung von Gelenkflüssigkeit liegt die Sensitivität bei 66 %. Die Spezifität ist in allen Geweben hoch (100 %) (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). Das bereits hohe Risiko falsch-negativer Ergebnisse ist bei antibiotisch vorbehandelten Patienten noch höher. Positive PCR-Ergebnisse können nicht nur aus der Existenz lebender Borrelien, sondern auch aus lebensunfähigen Fragmenten resultieren (PERSING et al., 1994).

1.7.2. Indirekte Nachweismethoden

Aufgrund der Limitationen direkter Nachweismethoden werden in der Praxis in der Regel Antikörper-Testsysteme zur Diagnostik genutzt (LITTMAN, 2003; AGUERO-ROSENFELD et al., 2005; LITTMAN et al., 2006; STEERE et al., 2008; BRANDA et al., 2010; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

1.7.2.1. Immunfluoreszenztest

In der Vergangenheit waren meist Immunfluoreszenztests (IFA) zum Nachweis von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* gebräuchlich. Diese Nachweismethode nutzt kultivierte Vollzell-Borrelien als Antigen. Sie führt zu einer Vielzahl an Problemen, die die Interpretation deutlich erschweren. So besteht keine Standardisierung innerhalb verschiedener Laboratorien, die Methode ist stark von der subjektiven Beurteilung des Laborpersonals abhängig, und es können durch Kreuzreaktivitäten, z. B. mit *Leptospira*-Antikörpern, falsch positive Ergebnisse entstehen (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). Desweiteren kann nicht zwischen Antikörpern nach Impfung und solchen nach einer Feldinfektion unterschieden werden (LITTMAN et al., 2006). Auch die Differenzierung zwischen IgM- und IgG-Antikörpern ist beim Hund nicht hilfreich, obwohl dies in der Humanmedizin gebräuchlich ist. Beim Hund können sich nämlich im Verlauf der chronischen Infektion immer wieder auch IgM- und IgG-Antikörper bilden. So kann mit der Differenzierung von IgM- und IgG-Antikörpern keine Aussage hinsichtlich eines möglichen Expositionszeitpunkts getroffen werden (MAGNARELLI et al., 1990; APPEL et al., 1993; STRAUBINGER et al., 1997;

KALISH et al., 2001; TOEPFER & STRAUBINGER, 2007; STANEK et al., 2012).

1.7.2.2. Enzyme-linked immunosorbent assay

Weitere Nachweismethoden für Antikörper gegen Borrelien sind enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in verschiedenen Modifikationen (z. B. KELA (kinetic enzyme-linked immunosorbent assay)). Bei herkömmlichen ELISA, die Vollzell-Borrelien als Antigen nutzen, besteht wie bei IFA-Methoden keine Möglichkeit, zwischen impfinduzierten und Antikörpern infolge natürlicher Infektion zu unterscheiden. Weiterhin gibt es Interpretationsschwierigkeiten durch mangelnde Standardisierung der Zusammensetzung der Assays und der Verwendung von Antigenen.

Der KELA bietet die Möglichkeit zur Automatisierung und einfacheren Durchführung und hat damit Vorteile gegenüber anderen Immunoassays (WORMSER et al., 1999; KALISH et al., 2001). Zudem ist der KELA im Vergleich zu einem Standard-End-Point-ELISA informativer und gewährleistet eine bessere Qualitätssicherung (SAMPSON et al., 1983; BARLOUGH et al., 1987). Die Kurve einer KELA-Messung ist direkt proportional zur Antikörperkonzentration in der untersuchten Probe, das heißt, bei einem KELA ist die Reaktionskurve zwischen Enzym und Substrat eine direkte Messung der relativen Antikörperkonzentration auf einer kontinuierlichen Skala. Dies ist in der Regel bei Messung der optischen Dichte eines End-Point-ELISA nicht der Fall. Hierfür müssten bei einem End-Point-ELISA Serienverdünnungen vorgenommen werden. Zudem werden Fehler in der Durchführung wie Pipettierfehler oder Fehler bei der Nutzung der Gerätschaften schnell entdeckt, wenn die Reaktionskurve nicht linear ist (BACON et al., 2003).

Ein neueres Testsystem stellt der C₆-ELISA dar. Dieser Test nutzt ein spezifisches synthetisches Peptid, das 25-mer C₆-Peptid. Dieses Peptid ist Teil der invariable region 6 (IR₆) innerhalb des variablen Oberflächenproteins VlsE. IR₆ ist innerhalb unterschiedlicher *B. burgdorferi*-Stämme konserviert und ausgeprägt immunogen im Hund (LIANG & PHILIPP, 1999; LIANG et al., 2000b). Dieser Test ist in der Veterinärmedizin mittlerweile als kommerzieller Schnelltest erhältlich (SNAP[®]4Dx[®] assay/SNAP[®]3Dx[®] assay, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME). Es konnte gezeigt werden, dass der Test nicht mit impfspezifischen

Antikörpern kreuzreagiert. Somit ist dieses Testsystem auch bei geimpften Tieren zum Nachweis einer Infektion geeignet. Auch mit anderen Spirochäten konnten keine Kreuzreaktionen nachgewiesen werden (LIANG et al., 2000b; LEVY, 2002). Der C₆-ELISA kann Antikörper gegen *B. burgdorferi* bereits in frühen Stadien der Infektion entdecken. So konnten bei experimentell infizierten Hunden bei 30 % der Tiere bereits drei Wochen *post infectionem* Antikörper nachgewiesen werden (LIANG et al., 2000b). Zudem fallen C₆-Antikörper nach einer Antibiotika-Therapie ab und steigen auch nicht wieder an (PHILIPP et al., 2001).

1.7.2.3. Western blot

Der Western blot ist eine Immunoblotting-Methode, bei der Antigene nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt wurden (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). Es ergeben sich unterschiedliche Bandenmuster, abhängig davon, ob eine natürliche Infektion, eine auf eine Impfung folgende Immunreaktion oder beide Gegebenheiten gleichzeitig vorliegen. Osp A (p31) wird in der Zecke und *in vitro* exprimiert und nicht während einer Infektion eines Säugetierwirtes. Daher wird die Entstehung dieser Bande mit einer vorausgegangenen Impfung assoziiert (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Allerdings beinhaltet der Western blot ebenfalls gewisse Limitationen. So ist die Interpretation eines Western blots abhängig von der subjektiven Beurteilung der Bandenintensität (ROBERTSON et al., 2000). Desweiteren können kreuzreagierende Antikörper (z. B. p41-Flagellin) und Reaktionen im Blot aufgrund anderer infektiöser oder nicht infektiöser Erkrankungen die Interpretation erschweren. Weiterhin kann das Vorhandensein unterschiedlicher Banden im Zuge der antigenetischen Variation im Verlauf einer Infektion die Beurteilung erschweren. Selbst Osp A, das eigentlich als impfspezifische Bande angesehen wird, kann selten auch bei subklinischer oder chronischer Infektion exprimiert werden (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005; LITTMAN et al., 2006). Trotz der Möglichkeit von Fehlinterpretationen gilt der Western blot als Gold Standard zur Bestätigung des Vorhandenseins von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* sl (DRESSLER et al., 1993; ENGSTROM et al., 1995). Die Nutzung kommerzieller Blots mit rekombinanten Antigenpräparationen erlaubt eine bessere Standardisierung dieses Testsystems und ermöglicht eine einfache Durchführung (WILSKE et al., 2007).

2. *Anaplasma phagozytophilum*

Der Erreger *Anaplasma phagozytophilum* (*A. phagozytophilum*) wurde erst bei Tieren, später dann beim Menschen entdeckt. Er wurde erstmals im Jahre 1932 in Leukozyten schottischer Schafe identifiziert; danach wurde die Infektion auch bei anderen Hauswiederkäuern wie Ziegen, Rindern und Hirschen als Auslöser des „Tick-borne Fever“ beschrieben (WOLDEHIWET, 1983). Infektionen bei Pferden wurden Ende der sechziger Jahre nachgewiesen (MADIGAN & GRIBBLE, 1987). Infektionen beim Hund wurden erstmals im Jahre 1982 in Kalifornien beschrieben (MADEWELL & GRIBBLE, 1982). Die humane granulozytäre Anaplasmosenose wurde erst zu Beginn der Neunziger Jahre in den Vereinigten Staaten entdeckt. Seit dieser Zeit wird sie allerdings als stetig zunehmende Erkrankung in USA, Europa und Asien wahrgenommen (CHEN et al., 1994; CARRADE et al., 2009).

2.1. Systematik

A. phagozytophilum ist ein Bakterium aus der Familie der *Anaplasmataceae* (Gattung: *Anaplasma*, Ordnung: *Rickettsiales*). Unter dieser Nomenklatur werden die vormalig einzeln geführten Erreger *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagozytophila* und das HGE-Agens (humane granulozytäre Ehrlichiose) als Varianten der Spezies *A. phagozytophilum* zusammengefasst (DUMLER et al., 2001). Diese Zusammenfassung fand aufgrund von Ergebnissen der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens statt. Allerdings wird diese neue Benennung durchaus kontrovers diskutiert, da sich die Erreger bezüglich ihres Zelltropismus von zuvor als *Anaplasma* bezeichneten Spezies (wie z. B. *Anaplasma marginale*) unterscheiden (Tab. 4) (UILENBERG et al., 2004; CARRADE et al., 2009).

Tab. 4: Taxonomie von *A. phagozytophilum* und anderen *Anaplasmataceae*
(CARRADE et al., 2009)

<i>Anaplasmataceae</i>				
<i>Anaplasma</i> (A.)	<i>Ehrlichia</i> (E.)	<i>Cowdria</i> (C.)	<i>Wolbachia</i> (W.)	<i>Neorickettsia</i> (N.)
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. canis</i>	<i>C. ruminantium</i>	<i>W. pipientis</i>	<i>N. helminthoeca</i>
<i>A. platys</i>	<i>E. ewingii</i>			<i>N. risticii</i>
<i>A. bovis</i>	<i>E. chaffeensis</i>			<i>N. sennetsu</i>
<i>A. centrale</i>				
<i>A. marginale</i>				

Für die Infektion von Pferden, Hunden und Menschen scheinen in Europa andere Stämme von *A. phagozytophilum* verantwortlich zu sein als die, die Hauswiederkäuer infizieren. Beim Hund wurden fünf genetische Varianten identifiziert; diese unterscheiden sich in ein bis zwei Nukleotiden in den 16S rRNA-Gensequenzen an den Positionen 54, 84, 86 oder 120 (POITOUT et al., 2005). Inwieweit diese genetischen Varianten die Pathogenität unterschiedlicher *A. phagozytophilum*-Stämme beeinflussen, ist nicht vollständig geklärt (CARRADE et al., 2009; SILAGHI et al., 2011).

2.2. Morphologie

Anaplasmen sind Gram-negative, pleomorphe, obligat intrazelluläre Bakterien mit einer Größe von 0,2 – 1,0 µm. Am besten sind sie mit einer Giemsa-Färbung sichtbar zu machen (DUMLER et al., 2005; WOLDEHIWET, 2010). Anaplasmen existieren in zwei möglichen Erscheinungsformen: Zum einen als kleine, dichte (dense-cored cells, DC), zum anderen als größere, weniger dichte, retikuläre Strukturen (reticulate cells, RC) (ISMAIL et al., 2010).

A. phagozytophilum infiziert im Säugetier vornehmlich neutrophile, aber auch eosinophile Granulozyten (WOLDEHIWET, 2010). Endothelzellen scheinen ein Reservoir für Anaplasmen zu sein; von dort aus kann der Erreger durch direkten Zellkontakt die Granulozyten infizieren (HERRON et al., 2005). Wahrscheinlich können sich die Bakterien über spezifische Liganden direkt an der Oberfläche der

Granulozyten anheften und über rezeptormediierte Endozytose in die Zelle gelangen. Dort erhalten sie Nährstoffe zur binären Teilung und reproduzieren sich in membrangebundenen Vesikeln unter der Bildung von Mikrokolonien, die als „Morulae“ bezeichnet werden (DUMLER et al., 2005; CARRADE et al., 2009; ISMAIL et al., 2010). Nach Lyse der infizierten Zellen werden die neu gebildeten Erreger in die Peripherie entlassen, um dort erneut weitere Granulozyten zu infizieren.

A. phagozytophilum verfügt über zahlreiche Strategien, eine Infektion zu etablieren. So ist der Erreger in der Lage, bedeutsame Funktionen der neutrophilen Granulozyten zur Abwehr von Bakterien zu stören (CARRADE et al., 2009). Beispielsweise sind Anaplasmen in der Lage, die Produktion von Superoxiden, die einen wesentlichen Teil der Abwehrmechanismen der Granulozyten bilden, zu verhindern (CARLYON & FIKRIG, 2006; RIKIHISA, 2006). Dies wird durch die Einschränkung der Transkription wichtiger Komponenten der Superoxidase ($gp91^{phox}$, *rac2*) erreicht (CARLYON et al., 2002; CHOI & DUMLER, 2003). Weiterhin beeinträchtigt *A. phagocytophilum* die Motilität und die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und vermindert die Fähigkeit der Granulozyten zur Adhärenz an Endothelien und zur Transmigration (DUMLER et al., 2005). Zudem zögert *A. phagozytophilum* die Apoptose der Granulozyten hinaus, die sonst bereits nach zehn bis zwölf Stunden stattfinden würde (CARLYON & FIKRIG, 2006; CARRADE et al., 2009). Dadurch können sich die Erreger über einen längeren Zeitraum teilen. So wird eine möglichst große Zahl an neuen Bakterien entlassen, die die Infektion aufrecht erhalten.

Das Überleben von *A. phagozytophilum* auch in scheinbar immunkompetenten Wirten wird durch komplexe Mechanismen antigenetischer Variation von Oberflächenproteinen des Erregers gesichert. Der genaue Mechanismus, mit dem Anaplasmen die Entdeckung und Elimination durch das Immunsystem umgehen, ist noch nicht genau bekannt (DUMLER et al., 2005; WOLDEHIWET, 2008). Vermutlich geschieht dies hauptsächlich durch die unterschiedliche Expression verschiedener Gene, die für das Oberflächenprotein p44 kodieren (ZHI et al., 1999).

2.3. Vektor *Ixodes* spezie

Wie auch *B. burgdorferi* wird *A. phagozytophilum* von Zecken des *Ixodes*-Komplexes übertragen. In Europa sind dies vorwiegend *I. ricinus*-Zecken.

2.3.1. Verbreitung und Infektionsraten von *Ixodes* spezie

Die Prävalenz von Infektionen der Vektoren in Deutschland variiert je nach geographischer Region (Tab. 5).

Tab. 5: Infektionsrate in Zecken in Deutschland (Inf.rate = Infektionsrate; PCR = Polymerase chain reaction; n. b. = nicht bestimmt)

Jahr	Nachweis- methode	Inf.- rate (%)	Anzahl Zecken			Referenz
			Gesamt	Nymphen	Adulte	
1999	PCR	2,2	295	n. b.	295	(BAUMGARTEN et al., 1999)
1999	PCR	1,6	492	91	315	(FINGERLE et al., 1999)
2003	PCR	2,3	305	243	62	(HILDEBRANDT et al., 2003)
2003	PCR	4,1	1055	73	982	(VON LOEWENICH et al., 2003)

2.3.2. Exposition und Übertragung

Die Infektionsraten sind abhängig vom Entwicklungsstadium der Zecken. So sind Nymphen im Vergleich zu Adulten und Larven häufiger mit *A. phagozytophilum* infiziert (WOLDEHIWET, 2010). *A. phagocytophilum* wird innerhalb der Zecken transstadiell übertragen. Eine vertikale Übertragung findet nicht statt (WOLDEHIWET, 2010). Zur erfolgreichen Infektion muss die Zecke zwischen 36 und 48 Stunden am Wirt anhaften (KATAVOLOS et al., 1998). Wie auch bei *B. burgdorferi* sl finden Infektionen mit *A. phagozytophilum* insbesondere zu den Jahreszeiten statt, in denen einerseits die Aktivität der Vektoren ihren Höchstpunkt erreicht und gleichzeitig sich sowohl Menschen als auch Hunde vermehrt im Freien aufhalten (CARRADE et al., 2009).

Als Reservoir für *A. phagozytophilum* dienen wildlebende Kleinsäuger, wie Mäuse, Ratten, Spitz- und Wühlmäuse sowie Rotwild und eventuell Vögel. Sowohl der Mensch wie auch der Hund stellen Fehlwirte dar.

Die meisten Infektionen finden durch Zeckenexposition statt (CARRADE et al., 2009). Es existieren einzelne Berichte von Infektionen ohne vorausgegangene Vektorexposition. Beim Menschen sind selten Infektionen durch direkten, engen Kontakt mit Sputum oder nach Bluttransfusion beschrieben (ZHANG et al., 2008). Auch gibt es einzelne Fallberichte über transplazentare Infektionen beim Menschen (HOROWITZ et al., 1998). In einem Fallbericht einer infizierten trächtigen Hündin mit Geburt eines mumifizierten Welpen waren bei den überlebenden Welpen jedoch keine Hinweise auf eine Infektion vorhanden (PLIER et al., 2009).

2.4. Epidemiologie

Die Antikörperprävalenz bei Hunden für *A. phagozytophilum* variiert innerhalb verschiedener geographischer Regionen (Tab. 6).

Tab. 6: Antikörperprävalenzen bei Hunden in verschiedenen Regionen Europas (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; IFA = Immunofluoreszenztest)

Region	Jahr	Methode	Infektionsrate (%)	Referenz
Deutschland	2008	C ₆ -ELISA (SNAP [®] 4Dx [®])	21,5	(STRAUBINGER et al., 2008)
Deutschland	2006	IFA	50,1	(BARUTZKI et al., 2006)
Deutschland	2007	IFA	43,1	(JENSEN et al., 2007)
Deutschland	2011	IFA	43,0	(KOHN et al., 2011)
Frankreich	2009	C ₆ -ELISA (SNAP [®] 4Dx [®])	2,7	(PANTCHEV et al., 2009)

2.5. Verlauf der Infektion

Nach einer Infektion mit *A. phagozytophilum* kommt es nach etwa vier bis sieben Tagen zur Bakteriämie. Nach experimenteller Infektion von Hunden konnte der Erreger bereits zwei Tage nach Infektion nachgewiesen werden (SCORPIO et al., 2011). Morulae konnten bei experimentell infizierten Hunden nach vier bis 14 Tagen im peripheren Blut nachgewiesen werden (EGENVALL et al., 1998; SCORPIO et al., 2011). Allerdings gelingt der Nachweis dieser intragranulozytären Einschlusskörper nicht bei allen infizierten Tieren. Bisher ist unklar, wo sich der Erreger repliziert, wenn er nach der Inokulation die Dermis

durchdrungen hat und bevor eine Bakteriämie nachweisbar ist (WOLDEHIWET, 2010).

Die Dauer der Bakteriämie ist ebenfalls noch nicht eindeutig bekannt. Manche Studien beschreiben eine Dauer von weniger als 28 Tagen (CARRADE et al., 2009). Allerdings existieren auch aktuelle Studien mit experimentell infizierten Tieren, in denen der Erreger auch am Ende der Untersuchung nach 60 Tagen noch nachweisbar war (EGENVALL et al., 1998).

In frühen Stadien der Infektion können noch keine Antikörper nachgewiesen werden. Studien mit experimentell infizierten Hunden konnten Antikörper, je nach Untersuchungsmethode, erstmals nach acht bis 30 Tagen *post infectionem* nachweisen (EGENVALL et al., 1998; CHANDRASHEKAR et al., 2010; SCORPIO et al., 2011). Wie lange Antikörper insbesondere in natürlich infizierten Hunden nachweisbar bleiben, ist nach wie vor unklar. Bei experimentell infizierten Hunden waren Antikörper noch bis zum Ende einer Studie nach vier Monaten zu finden (EGENVALL et al., 2000). In einer Studie mit natürlich infizierten Hunden konnten Antikörper sogar noch nach zwölf Monaten nachgewiesen werden (EGENVALL et al., 1997).

2.6. Symptome der Granulozytären Anaplasmose

Nach einer Infektion mit *A. phagozytophilum* entwickeln viele Menschen und Hunde keine klinischen Symptome. Klinisch manifeste Infektionen scheinen beim Menschen in Europa im Vergleich zu den USA generell seltener zu sein (BLANCO & OTEO, 2002), was auf unterschiedliche Pathogenität verschiedener Stämme schließen lässt. Der Schweregrad einer klinisch manifesten Infektion kann sowohl beim Mensch wie auch beim Hund von mild und selbstlimitierend bis zu einer schweren Verlaufsform variieren. In Europa existieren bisher allerdings weder Berichte von HGE-assoziierten Todesfällen beim Menschen noch von fatalen Krankheitsverläufen beim Hund (NEER et al., 2002; DUMLER et al., 2005; CARRADE et al., 2009).

2.6.1. Humane Granulozytäre Anaplasmosen

In Europa existieren 66 Fallberichte über klinisch manifeste Infektionen mit *A. phagozytophilum*. In den USA werden je nach Region 24 bis 58 pro 100 000 Patienten mit einer Anaplasmosen registriert (BAKKEN et al., 1996; IJDO et al., 2000; DUMLER et al., 2005; DUMLER et al., 2007b). Bei etwa der Hälfte aller Patienten, die Symptome einer Anaplasmosen zeigen, sind diese so ausgeprägt, dass ein Klinikaufenthalt notwendig wird. Davon erhalten 5 bis 7 % Prozent intensivmedizinische Betreuung. Mindestens drei Todesfälle sind beschrieben, die auf sekundäre Pilz- oder Virusinfektionen zurückzuführen waren (DUMLER et al., 2005). Ältere Patienten, solche mit ausgeprägter Neutrophilie, Lymphopenie, Anämie und Immunsuppression zeigen schwerere Verläufe und müssen eher hospitalisiert werden (BAKKEN et al., 1996).

Zu den am häufigsten auftretenden Symptomen zählen Unwohlsein, Fieber, Myalgien und Kopfschmerz. Eine geringere Anzahl der Patienten zeigt Gelenkschmerzen (37 %), gastrointestinale Symptome (19 %) oder Atembeschwerden (10 %) (DUMLER et al., 2005; DUMLER et al., 2007a; DUMLER et al., 2007b; BAKKEN & DUMLER, 2008). Zu gravierenden möglichen Komplikationen einer Infektion zählen neben schweren sekundären Infektionen (bakteriell, durch Pilze, viral), Sepsis oder toxic shock-like syndrome mit disseminierter intravasaler Koagulopathie, acute respiratory distress syndrome (ARDS), akute Niereninsuffizienz und periphere Polyneuropathien (ISMAIL et al., 2010). Ein Auftreten von Exanthemen wurde diskutiert, konnte aber nicht spezifisch mit einer *A. phagozytophilum*-Infektion assoziiert werden. Hautrötungen konnten bei 6 % der Patienten beobachtet werden, darunter bei zwei Patienten aus Europa (BLANCO & OTEO, 2002). Mögliche Koinfektionen mit *B. burgdorferi* sl könnten ebenfalls für das Auftreten dieser Hautsymptome verantwortlich sein. Die häufigsten labordiagnostischen Veränderungen sind Thrombozytopenie, Leukopenie, Anämie und erhöhte Aktivitäten von Leberenzymen (BLANCO & OTEO, 2002; DUMLER et al., 2005).

2.6.2. Canine Granulozytäre Anaplasmosen

Wie auch beim Menschen führt eine klinisch manifeste Infektion mit *A. phagozytophilum* zu einer meist fieberhaften Allgemeinerkrankung. Klinische Symptome im initialen Stadium sind meist unspezifisch (EGENVALL et al., 1997; NEER et al., 2002; KOHN et al., 2008).

2.6.2.1. Experimentelle Infektionen

In drei Studien mit experimentell infizierten Beagles waren die vorherrschenden klinischen Symptome reduziertes Allgemeinbefinden und Fieber. Die Schwere der Symptome variierte allerdings deutlich (EGENVALL et al., 1998; EGENVALL et al., 2000; SCORPIO et al., 2011). In der ersten Studie mit sieben experimentell infizierten Hunden zeigten fünf von sieben Hunden nach vier bis elf Tagen hohes Fieber und reduziertes Allgemeinbefinden. Einzelne Hunde zeigten während der febrilen Phase Anorexie (1/7), Lahmheit (1/7) und Schwanken (1/7). Darüber hinaus wurden keine weiteren klinischen Symptome beobachtet (EGENVALL et al., 1998). In der zweiten Studie zeigten zwei von drei experimentell infizierten Hunden direkt nach der Inokulation mit infektiösem Blut über zwei bis drei Tage Fieber. Danach wurden keine weiteren klinischen Veränderungen beobachtet (EGENVALL et al., 2000). In der dritten experimentellen Studie zeigte nur einer von sechs infizierten Hunden Fieber, mit der höchsten Temperatur nach sieben bis zehn Tage nach Infektion. Weitere Symptome waren eine vorübergehende generalisierte Lymphadenopathie und bilaterale sklerale Injektionen. Darüber hinaus waren alle Tiere klinisch unauffällig (SCORPIO et al., 2011).

Labordiagnostisch zeigten alle experimentell infizierten Hunde deutliche hämatologische Veränderungen während der akuten Krankheitsphase. Vorherrschend waren Thrombozytopenien, die alle infizierten Hunde aller drei experimentellen Studien entwickelten (EGENVALL et al., 1998; EGENVALL et al., 2000; SCORPIO et al., 2011). Weiterhin wurden Anämie sowie Leukopenie mit Neutropenie und Lymphopenie in allen Tieren der ersten beiden Studien beobachtet (EGENVALL et al., 1998; EGENVALL et al., 2000). In der Studie aus dem Jahr 2011 waren diese Veränderungen jedoch nur sehr gering; hier blieben die Leukozytenzahlen der meisten Tiere innerhalb des Referenzbereiches (SCORPIO et al., 2011). Während der febrilen Phase war eine Hypalbuminämie als Veränderung der Serumchemie wahrnehmbar (EGENVALL et al., 1998).

2.6.2.2. Feldinfektionen

Aktuell existieren neben einzelnen Fallberichten nur wenige umfangreichere Studien, die die klinische Manifestation von natürlich mit *A. phagozytophilum* infizierten Hunden beschreiben (GREIG et al., 1996; EGENVALL et al., 1997; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008; GRANICK et al., 2009; EBERTS et al., 2011). In vier dieser Studien wurde die Infektion anhand des Vorliegens von

Antikörpern oder von intragranulozytären Einschlusskörpern diagnostiziert. Bei diesen Hunden war eine *E.-canis*-Infektion durch Antikörpernachweis ausgeschlossen worden (EGENVALL et al., 1997; POITOUT et al., 2005; GRANICK et al., 2009); in zwei Studien wurde die Infektion mittels PCR diagnostiziert. Bei den Studien an natürlich infizierten Tieren war die Infektion zwar nachgewiesen, ein kausaler Zusammenhang zu den beobachteten Symptomen konnte jedoch nicht sicher bewiesen werden (KOHN et al., 2008).

Ähnlich wie beim Menschen zählen zu den am meisten beobachteten Symptomen einer klinisch relevanten Infektion Schwäche oder reduziertes Allgemeinbefinden und Fieber, das in nahezu 90 % (GREIG et al., 1996; EGENVALL et al., 1997; POITOUT et al., 2005; GRANICK et al., 2009; EBERTS et al., 2011) bzw. 66 % (KOHN et al., 2008) der Patienten vorhanden war. Desweiteren wurde Anorexie bei bis zu 82 % der Hunde beobachtet. Symptome des Bewegungsapparates wie Bewegungsunlust und Lahmheiten wurden bei bis zu 62 % der Hunde beschrieben. Zu weiteren, vereinzelt beschriebenen Symptomen zählen Husten, Polydipsie, blasse Schleimhäute, gastrointestinale Symptome sowie Blutungsneigungen in Form von Petechien oder Epistaxis (EGENVALL et al., 1997; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008; GRANICK et al., 2009; EBERTS et al., 2011).

Manifestationen des zentralen Nervensystems, wie sie in wenigen Fällen beim Menschen beschrieben sind, wurden beim Hund vereinzelt mit einer Anaplasmen-Infektion assoziiert (MARETZKI et al., 1994; GREIG et al., 1996). In einer retrospektiven Studie über 248 Hunde mit Erkrankungen des zentralen Nervensystems konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen neurologischen Beeinträchtigungen und einer *A. phagozytophilum*-Infektion nachgewiesen werden (JADERLUND et al., 2007). Eine weitere prospektive Studie derselben Arbeitsgruppe untersuchte 54 Hunde mit entzündlichen und nichtentzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (JADERLUND et al., 2009). Bei Hunden mit entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems konnten weder im Blut noch im Liquor Antikörper gegen Anaplasmen oder bakterielle DNA nachgewiesen werden. Bei Hunden mit anderen als entzündlichen neurologischen Erkrankungen wurden zwar bei 21 % der Hunde Antikörper im Blut gefunden, aber keine Antikörper im Liquor und auch keine DNA in Blut oder Liquor. Daher schlussfolgern die Autoren dieser Studie, dass *A.*

phagozytophilum als Ursache für neurologische Erkrankungen beim Hund unwahrscheinlich ist (JADERLUND et al., 2009).

Labordiagnostisch ist eine Thrombozytopenie die am häufigsten beschriebene Veränderung, die bei über 90 % der Patienten auftritt. Weitere mögliche Laborveränderungen sind Lymphopenie, Anämie (meist aregenerativ), Monozytose, Hyperglobulinämie, Hypalbuminämie sowie erhöhte Aktivität von Leberenzymen (GREIG et al., 1996; EGENVALL et al., 1997; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008; EBERTS et al., 2011).

2.7. Diagnostik

Zur Diagnose einer Infektion mit *A. phagozytophilum* können direkte wie auch indirekte Nachweismethoden herangezogen werden (CARRADE et al., 2009).

2.7.1. Direkte Nachweismethoden

Zum direkten Nachweis von *A. phagozytophilum* stehen die Kultivierung des Erregers, die mikroskopische Untersuchung von Blutausstrichen sowie die Polymerase-Kettenreaktion zur Verfügung (CARRADE et al., 2009).

2.7.1.1. Kultivierung von *Anaplasma phagozytophilum*

Die Kultivierung von *A. phagozytophilum* in HL-60-Zelllinien (human promyelocytic leukemia cell lines) ist im positiven Falle beweisend für eine akute Infektion. Ein negatives Ergebnis schließt jedoch eine Infektion nicht aus. Die Kultivierung benötigt meist mehrere Wochen. Desweiteren beeinflusst eine Vorbehandlung mit Antibiotika die Sensitivität der Methode. Damit ist sie insbesondere für vorbehandelte Patienten ungeeignet (ISMAIL et al., 2010).

2.7.1.2. Mikroskopische Untersuchung von Blutausstrichen

Der Nachweis von granulozytären Einschlüssen (Morulae) in neutrophilen Granulozyten beweist das Vorhandensein von Rickettsien-artigen Erregern; eine eindeutige Unterscheidung von anderen *Ehrlichia*-Spezies ist aber anhand der Morulae nicht möglich (CARRADE et al., 2009). Morulae treten nur im akuten Stadium der Infektion auf, und nicht jede aktive Infektion geht mit sichtbaren intragranulozytären Einschlusskörpern einher (EGENVALL et al., 1998; STANDAERT et al., 2000; EBERTS et al., 2011; SCORPIO et al., 2011). Bei experimentell infizierten Hunden konnten bei allen Tieren innerhalb von vier bis 14 Tagen *post infectionem* intragranulozytäre Einschlusskörper über einen

Zeitraum von vier bis acht Tagen nachgewiesen werden (EGENVALL et al., 1998; SCORPIO et al., 2011).

2.7.1.3. Polymerase-Kettenreaktion

Es existieren verschiedene PCR-Assays, die DNA von *A. phagozytophilum* in Blut, Knochenmark sowie Milzgewebe nachweisen können (CARRADE et al., 2009). Die meisten Assays nutzen entweder das 16S-rRNA-Gen oder das Gen des Oberflächenproteins *msp2* (p44). PCR-Methoden, die Letzteres nutzen, gelten als spezifisch für *A. phagozytophilum*. Bei der Nutzung des 16S-rRNA-Gens werden eventuell auch andere *Anaplasma*-Spezies oder andere intrazelluläre Bakterien, wie beispielsweise *Bartonella henselae*, nachgewiesen.

Die PCR ermöglicht den Nachweis des Erregers bereits in frühen Stadien der Infektion; bei experimentell infizierten Hunden konnte der Erreger bereits nach zwei Tagen *post infectionem* durch PCR nachgewiesen werden. Die PCR war in einer Studie über einen Zeitraum von 20 Tagen positiv, in einer anderen Studie bis zum Ende der Untersuchung nach 60 Tagen (EGENVALL et al., 2000; SCORPIO et al., 2011). Bei immunsupprimierten Tieren kann die PCR sogar über mehrere Wochen positiv bleiben (EGENVALL et al., 2000). Die vorhandene Menge an Pathogen beeinflusst die Sensitivität. Daher sind bei geringer zirkulierender Pathogenmenge falsch negative PCR-Ergebnisse möglich (EGENVALL et al., 1998; EGENVALL et al., 2000; BEALL et al., 2008; GRANICK et al., 2009).

2.7.2. Indirekte Nachweismethoden

Zu häufig angewandten indirekten Nachweismethoden gehören der Nachweis von Antikörpern mittels IFA sowie ELISA (NEER et al., 2002). Während der frühen Infektion sind häufig noch keine Antikörper nachweisbar (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; EBERTS et al., 2011). Das kann im akuten Stadium einer Infektion zu falsch negativen Ergebnissen führen. Experimentelle Studien beschreiben, dass IgG-Antikörper mittels IFA zehn bis 30 Tage nach einer Infektion erstmals nachgewiesen wurden (EGENVALL et al., 1998; SCORPIO et al., 2011). Wie lange Antikörper nachgewiesen werden können, ist insbesondere bei natürlich infizierten Hunden nach wie vor unklar. Daten beschreiben, dass Antikörper in natürlich infizierten Hunden über mehrere Monate bis zu mindestens einem Jahr persistieren können (EGENVALL et al., 1997). Bei Menschen persistieren Antikörper sogar über Jahre hinweg (BAKKEN &

DUMLER, 2008).

2.7.2.1. Immunfluoreszenztest

Immunfluoreszenztests nutzen Vollzell-Antigene zum Nachweis von Antikörpern gegen *A. phagozytophilum*.

Eine wichtige Limitation des IFA besteht im Risiko möglicher Kreuzreaktivitäten mit anderen Rickettsien, wie beispielsweise *A. platys* und *E. canis* (NICHOLSON et al., 1997; SUKSAWAT et al., 2000; CHANDRASHEKAR et al., 2010).

Zudem ist die Interpretation von IFA-Methoden subjektiv. Dies kann sowohl zu falsch negativen als auch falsch positiven Ergebnissen führen. Eine weitere Limitation der Methode besteht in der mangelnden Standardisierung zwischen den Laboratorien. Das führt dazu, dass Testergebnisse teils schwierig zu interpretieren sind (NEER et al., 2002).

2.7.2.2. Enzyme-linked immunosorbent assay

Konventionelle ELISA Techniken weisen ähnliche Limitationen auf wie der IFA, da diese Tests ebenfalls auf der Nutzung von Vollzell-Antigenpräparationen basieren. So können auch beim ELISA Kreuzreaktivitäten mit anderen Erregern wie *A. platys* und *E. canis* zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Mit dem SNAP[®]4Dx[®] (IDEXX, Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) ist seit Kurzem ein neues ELISA-Testsystem erhältlich. Dieser Test nutzt als Antigen ein synthetisches Peptid des immundominanten p44-Oberflächenproteins. Durch die Verwendung eines hochspezifischen und gereinigten synthetischen Peptids ist dieser Test konventionellen Systemen bezüglich Antigenvariabilität und Kontaminationsrisiken von Antigenpräparationen überlegen (CHANDRASHEKAR et al., 2010). Dieser Test zeichnet sich zudem durch einfache Handhabung und durch die schnelle Bereitstellung von Untersuchungsergebnissen aus. Eine Kreuzreaktivität mit anderen, nah verwandten Erregern, insbesondere *A. platys*, kann jedoch auch bei diesem Testsystem nicht ausgeschlossen werden. Die Sensitivität des SNAP[®]4Dx[®] wird vom Hersteller mit 99,1 %, die Spezifität mit 100 % angegeben (CHANDRASHEKAR et al., 2008; CHANDRASHEKAR et al., 2010).

III. STUDIE I

**Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and
Anaplasma phagocytophilum, and their clinical relevance in dogs in Munich,
Germany**

Charlotte Barth¹

Reinhard K. Straubinger, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Ph.D.²

Carola Sauter-Louis, Dr. med. vet., Ph.D. (epidemiology), Dipl. ECVPH³

Katrin Hartmann, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA¹

¹Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

²Institute for Infectious Medicine and Zoonotic Diseases, LMU University of Munich, Germany

³Clinic for Ruminants with Ambulatory Clinic and Herd Health Management, LMU University of Munich, Germany

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, veröffentlicht

Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2012; Jul-Aug;125(7-8):337-44

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 125,
337–344 (2012)
DOI: 10.2376/0005-9366-125-337

© 2012 Schlötersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
vorstandsassistenz@medizinische-
klientierklinik.de

Eingegangen: 01.04.2011
Angenommen: 25.10.2011

Summary

Zusammenfassung

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2012/12507-337 \$ 15.00/0

Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany¹
Institute for Infectious Medicine and Zoonotic Diseases, LMU University, Munich, Germany²
Clinic for Ruminants with Ambulatory Clinic and Herd Health Management, LMU University, Munich, Germany³

Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany

Prävalenzen von Antikörpern gegen Borrelia burgdorferi sensu lato und Anaplasma phagocytophilum und deren klinische Bedeutung bei Hunden im Raum München, Deutschland

Charlotte Barth¹, Reinhard K. Straubinger², Carola Sauter-Louis³, Katrin Hartmann¹

Although prevalences of antibodies against *Borrelia* (*B.*) *burgdorferi* sensu lato (*sl*) and *Anaplasma* (*A.*) *phagocytophilum* have been reported to be high in the German dog population, the importance of the diseases caused by both agents is still not well characterized in a field situation. The aim of this study was (1) to determine the prevalence of antibodies to *B. burgdorferi* *sl* and *A. phagocytophilum* in dogs in Munich, Germany, and (2) to assess the clinical presentation and laboratory values of antibody-positive dogs and compare them to a negative control group.

In total, 448 randomly selected dogs were screened for antibodies to *B. burgdorferi* *sl* and *A. phagocytophilum* with the SNAP[®] 4Dx[®] assay (IDEXX, Laboratories, Inc., USA). Dogs carrying antibodies against *B. burgdorferi* *sl* and/or *A. phagocytophilum* were classified as "positive" (*n* = 100), the following 100 negative dogs served as control group. In both groups, physical examination and laboratory parameters were compared. 22 (4.9%) dogs had antibodies to *B. burgdorferi* *sl*, 78 (19.4%) to *A. phagocytophilum*, nine (2.0%) to both agents. Bernese Mountain Dogs had significantly more often antibodies against *B. burgdorferi* *sl*. Negative dogs were more often diagnosed as "healthy" compared to *A. phagocytophilum* antibody-positives that showed more often elevated body temperature and poor general condition; beyond that, there were no differences in clinical and laboratory abnormalities between both groups. Although dogs tested negative were more often considered healthy, there were no differences in parameters considered "specific" for both infections between dogs with and without antibodies. Hence, tests detecting antibodies against both agents are not able to detect animals with the clinical disease.

Keywords: SNAP[®] 4Dx[®], Lyme disease, granulocytic anaplasmosis

Obwohl die Prävalenz von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* *sl*) und *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) in der deutschen Hundepopulation als hoch angenommen wird, ist das klinische Bild der durch diese Erreger ausgelösten Krankheiten unter Feldbedingungen nach wie vor wenig charakterisiert. Ziel dieser Studie war es, (1) die Prävalenz von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* *sl* und *A. phagocytophilum* zu bestimmen sowie (2) die klinischen Symptome und labordiagnostischen Veränderungen von antikörperpositiven Hunden aufzuzeigen und diese mit einer negativen Kontrollgruppe zu vergleichen. 448 randomisiert ausgewählte Hunde wurden anhand des SNAP[®] 4Dx[®] Assays (IDEXX, Laboratories, Inc., USA) auf das Vorliegen von Antikörpern gegen *B. burg-*

dorferi sl und *A. phagocytophilum* getestet. Davon wurden 100 Hunde mit Antikörpern gegen *B. burgdorferi* sl und/oder *A. phagocytophilum* als „positiv“ klassifiziert; die darauffolgenden 100 negativ getesteten Hunde dienten als Kontrollgruppe. Klinische und labor diagnostische Parameter wurden innerhalb beider Gruppen verglichen. 22 Hunde (4,9 %) hatten Antikörper gegen *B. burgdorferi* sl, 78 Hunde (19,4 %) gegen *A. phagocytophilum*, neun Hunde (2,2 %) gegen beide Erreger. Berner Sennenhunde hatten signifikant häufiger Antikörper gegen *B. burgdorferi* sl. Bei negativ getesteten Hunden wurde häufiger die Diagnose „gesund“ gestellt als bei Tieren mit Antikörpern gegen *A. phagocytophilum*, welche häufiger eine erhöhte Körpertemperatur sowie schlechtes Allgemeinbefinden zeigten. Darüber hinaus bestanden keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich klinischer oder labor diagnostischer Veränderungen. Obwohl negativ getestete Hunde generell häufiger gesund waren, gab es zwischen Tieren mit oder ohne Antikörpern keine signifikanten Unterschiede in all den Parametern, deren Veränderung als spezifisch für Infektionen mit beiden Erregern gelten. Folglich ist der Test, der Antikörper gegen beide Erreger nachweist, nicht in der Lage, kranke Tiere zu identifizieren.

Schlüsselwörter: SNAP®4Dx®, Lyme-Borreliose, granulozytäre Anaplas-mose

Introduction

Borrelia (*B.*) *burgdorferi* sensu lato (sl), the helical-shaped, motile, spirochetal agent of Lyme disease, and *Anaplasma* (*A.*) *phagocytophilum*, an obligate intracellular Gram-negative bacteria causing granulocytic anaplasmosis, are tick-borne pathogens infecting dogs as well as humans on the northern hemisphere (Bakken et al., 1994; Stuenkel, 2007). Both infections are transmitted by ticks of the genus *Ixodes*. The infection rates of these ticks vary among geographic regions and tick developmental stage (Blanco and Oteo, 2002; Rauter and Hartung, 2005; Nieto and Foley, 2008) with up to a prevalence of 36.2% for *B. burgdorferi* sl (Fingerle et al., 1999b) and up to 4.1% for *A. phagocytophilum* in Germany (Baumgarten et al., 1999; Fingerle et al., 1999a; von Loewenich et al., 2003). Coinfections in ticks range from 0.1% to 13.3% (Fingerle et al., 1999b; Nieto and Foley, 2008).

The prevalence of antibodies to *B. burgdorferi* sl in dogs shows regional differences, and the results of antibody surveys differ relative to the evaluated geographic area, health status, and the diagnostic method used for antibody detection. A current antibody survey revealed a prevalence of antibodies to *B. burgdorferi* sl of 9.7% in dogs from different parts of Germany (Krupka et al., 2007; Straubinger et al., 2008). An older study from northern Bavaria demonstrated a prevalence of 35.5% (Weber et al., 1991). Previous surveys reported antibody prevalences for *A. phagocytophilum* in German dogs of up to 50.1% (Barutzki et al., 2006; Jensen et al., 2007), while the above-mentioned recent study revealed rates of 17.6% to 31.1% depending on the evaluated geographic area (Krupka et al., 2007; Straubinger et al., 2008).

Although very common, the clinical implication in both infections in naturally infected dogs is still poorly understood (Nieto and Foley, 2008). *B. garinii* and *B. afzelii* seem to be the most widespread *Borrelia* genospecies in ticks found in Central Europe, while *B. burgdorferi* sensu stricto (ss), the predominant genospecies in North America, is rarely present in Germany. Results of numerous studies suggest a different organotropism of the three pathogenic *Borrelia* species, and their pathogenic-

ity seems to differ (Busch et al., 1996; Picken et al., 1998; Jaulhac et al., 2000; Baranton et al., 2001; Plesman and Cern, 2004). Dogs experimentally infected with *B. burgdorferi* sl develop acute mono- or oligoarthritis in the limb closest to the tick bite (Straubinger et al., 1997). There are currently no data about outcome of experimental infections of dogs with *B. garinii* or *B. afzelii*. Most likely, most dogs infected in the field with *B. burgdorferi* sl remain asymptomatic (Fritz and Kjemtrup, 2003; Littman, 2003). Dogs experimentally infected with a canine *Ehrlichia* species isolate closely related to *A. phagocytophilum* and identical to the granulocytic ehrlichiosis agent in regard to the 16S rRNA gene sequence showed high fever and depression and developed profound thrombocytopenia as well as moderate leucopenia (Egenvall et al., 1998). Data concerning natural infections with *A. phagocytophilum* are only available from case series that describe mild to severe symptoms of a multisystemic disorder including fever, anorexia, depression, musculoskeletal dysfunction with lameness and reluctance to move (Greig et al., 1996; Pottout et al., 2005), and central nervous system signs (Neer et al., 2002).

Hence, although *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum* contact can lead to clinical signs after experimental infection and antibodies to both infectious agents are frequently recorded, data concerning their prevalence in dogs with specific and their clinical relevance in the field are hardly available. The aim of this study was to determine the prevalence of antibodies to both organisms in randomly selected healthy and sick dogs in the area of Munich, Germany. In addition, dogs with antibodies to *B. burgdorferi* sl or *A. phagocytophilum* were compared to a randomly selected control group with regard to anamnestic data, clinical signs, and laboratory results.

Material and Methods

Dogs

448 dogs that were presented at the Clinic of Small Animal Medicine of the LMU University of Munich, Germany, from October, 2006 to February, 2008 were prospectively and randomly included in the study. All

dogs entering the Munich Teaching Hospital in which the owners were willing to participate were screened for the presence of antibodies to *B. burgdorferi* sl and *A. phagocytophilum* using an enzyme-linked immunosorbent assay (SNAP®4Dx®, IDEXX, Laboratories, Inc., USA). The sampling was performed until 100 dogs with antibodies to *B. burgdorferi* sl and/or *A. phagocytophilum* were collected. This number was reached after testing a total of 448 dogs. Dogs were either healthy or presented for various clinical signs. There were no exclusion criteria.

To compare dogs with antibodies to *B. burgdorferi* sl and/or *A. phagocytophilum* versus negatively tested dogs concerning anamnestic data, clinical presentation, and laboratory results, the following study design was used. 100 dogs with antibodies to *A. phagocytophilum* and/or *B. burgdorferi* sl were classified as "positive group". The control group ("negative group", $n = 100$) consisted of the next negatively testing dogs directly following a patient with antibodies to *B. burgdorferi* sl and/or *A. phagocytophilum*. Data of the positively tested dogs were compared to those of the negative control group.

Clinical status

In those 200 dogs (100 control dogs without detectable antibodies against *B. burgdorferi* sl and/or *A. phagocytophilum*, 100 dogs antibody-positive for *B. burgdorferi* sl and/or *A. phagocytophilum*), a physical examination and laboratory tests (complete blood count, serum biochemistry profile) were performed. Blood smears were screened for the presence of intragranulocytic morulae-like structures by light microscopy. Anamnestic data was collected by a questionnaire answered by the owner. The questionnaire provided data concerning environment (rural versus urban), vaccination status, travel history, possible tick infestations, tick prevention, prior medication during the past twelve months with antibiotics or immunosuppressant drugs, and the reason for patient's presentation to the hospital. Animals with antibodies against one or both pathogens were compared to the negative controls concerning clinical status and laboratory parameters.

Antibody testing

Whole blood was tested for the presence of antibodies against *B. burgdorferi* sl and *A. phagocytophilum* using the SNAP®4Dx® (IDEXX, Laboratories, Inc., USA) ELISA following the manufactures instructions. The test was

performed immediately after the blood sampling. The SNAP assay uses the C₆ technology for the detection of antibodies to *B. burgdorferi* sl. This technology is based on the detection of antibodies to the highly specifically conserved immunodominant region of the VlsE surface antigen (C₆ peptide). For the detection of antibodies to *A. phagocytophilum*, the assay uses a peptide derived of the major outer surface protein. The SNAP®4Dx® (IDEXX, Laboratories, Inc., USA) also detects *Ehrlichia canis* antibodies and canine heartworm antigen (the detection of these pathogens was not subject of this study).

Statistical evaluation

Differences between dogs of the positive group and those of the negative group concerning categorical parameters were statistically analyzed using a Pearson's Chi-square test. The statistical analysis was performed using SPSS software v.16.0., with a significance level at 0.05. Comparisons between the three categories within the positive group (*B. burgdorferi* sl antibody-positive, *A. phagocytophilum* antibody-positive, *B. burgdorferi* sl plus *A. phagocytophilum* antibody-positive) were performed using Pearson's Chi-square test including a Bonferroni correction for multiple testing, which reduced the significance level from $p < 0.05$ to $p < 0.01$.

Results

Prevalence of Antibodies to *B. burgdorferi* sl and *A. phagocytophilum*

Antibodies to *B. burgdorferi* sl were detected in 22 (4.9%; 95% CI 3.27–7.32) dogs and to *A. phagocytophilum* in 78 (19.4%; 95% CI 14.18–21.20) of the 448 tested dogs. Nine dogs (2.0%; 95% CI 1.06–3.77) had concurrently antibodies to both organisms.

Comparison of positive versus negative dogs

Age of dogs of the negative group ranged between six months and 15 years (median seven years). Age of dogs of the *B. burgdorferi* sl and/or *A. phagocytophilum* antibody-positive group ranged between seven month and 17 years (median six years). The negative group consisted of 57 females (30 neutered) and 43 males (six neutered) dogs. The positive group consisted of 43 female (23 neutered) and 57 male (24 neutered) dogs. There were no significant differences in age between the nega-

TABLE 1: Number of dogs of different breeds (breeds with less than three dogs were classified as „others“) in the negative and the positive group as well as within the positive group (B +, A +, B/A +); antibody-positive for *B. burgdorferi* sl (B +), antibody-positive for *A. phagocytophilum* (A +), antibody-positive for both agents (B/A +), negative (neg.)

	Negative Group	Positive Group	p-value	B +	A +	B/A +	p-value (in case of a significant difference between the pos. and the neg. group)
Mixed Breed	25/100	30/100	0.526	1/13	26/78	3/9	
Bernese Mountain Dog	1/100	12/100	0.002	3/13	3/78	6/9	0.040 (B + versus neg.) < 0.001 (B/A + versus neg.)
West Highland White Terrier	2/100	4/100	0.678	1/13	3/78	0/9	
Cocker Spaniel	3/100	3/100	0.678	0/13	3/78	0/9	
Golden Retriever	3/100	2/100	1.000	0/13	2/78	0/9	
Boxer	3/100	1/100	0.613	0/13	1/78	0/9	
Labrador Retriever	7/100	1/100	0.070	1/13	0/78	0/9	
German Shepherd Dog	4/100	1/100	0.365	0/13	1/78	0/9	
Rottweiler	3/100	1/100	0.613	1/13	0/78	0/9	
Jack Russell Terrier	5/100	1/100	0.213	0/13	1/78	0/9	
Others	44/100	44/100	0.886	6/13	38/78	0/9	

TABLE 2: Number of dogs with a specific history (including history of evident tick exposure, environment, travel history, prior treatment with antibiotics and immunosuppressive drugs) in the negative and the positive group as well as within the positive group (B +, A +, B/A +); antibody-positive for *B. burgdorferi* sl (B +), antibody-positive for *A. phagocytophilum* (A +), antibody-positive for both agents (B/A +)

	Negative Group	Positive Group	p-value	B +	A +	B/A +	p-value (in case of a significant difference between the pos. and the neg. group)
Evidence of tick exposure	66/100	90/100	< 0.001	11/13	70/78	9/9	< 0.001 (A + versus neg.)
Living in rural areas	38/100	29/100	0.211	2/13	27/78	1/9	
Living in urban areas	61/100	71/100	0.211	11/13	51/78	8/9	
Travel history	50/100	57/100	0.394	8/13	48/78	2/9	
Prior treatment with antibiotics	36/100	36/100	0.882	4/13	30/78	2/9	
Prior treatment with immunosuppressive drugs	21/100	11/100	0.082	0/13	9/78	2/9	

tive and the positive group. Male dogs had significantly more often antibodies to *B. burgdorferi* sl and/or *A. phagocytophilum* than female dogs ($p = 0.006$; $RR = 1.51$; 95% CI 1.14–2.00). Within the positive group, there was no statistical difference concerning gender. Neutering had no significant influence on the presence of antibodies.

Body condition score ranged in both groups from 2/5 to 5/5 (median 3/5, no significant difference between the positive and the negative group).

Breed distribution, anamnestic data, clinical signs and diagnoses, as well as laboratory changes of dogs of the negative and the positive group are listed in Table 1 to Table 4. Bernese Mountain Dogs were significantly more often present in the positive group ($p = 0.002$; OR 13.5 [1.77–283.5]) than in the negative control group. Within the positive group, Bernese Mountain Dogs had more often antibodies to *B. burgdorferi* sl ($p = 0.004$, OR 29.70 [2.36–821.35]) and to both organisms ($p < 0.001$; OR 28.33 [4.6–200.8]) than dogs of other breeds (Tab. 1).

Dogs of the positive group had significantly more often a history of tick exposure than negatives ($p < 0.001$, OR 0.22 [0.09–0.49]). This difference was caused by the *A. phagocytophilum* antibody-positive dogs ($p < 0.001$, OR 4.51 [1.83–11.45]) that more commonly had a history of tick exposure. Otherwise, there were no significant differences in anamnestic data between the negative and the positive group (Tab. 2).

Dogs of the negative group were presented significantly more often for preventative health care than positive dogs ($p = 0.013$, OR 2.21 [1.13–4.36]). There were no

other significant differences between the negative and the positive group concerning disease history.

In physical examination, dogs of the negative group were significantly more often diagnosed as "healthy" than dogs of the positive group ($p = 0.003$, OR 2.70 [1.31–5.63]). This difference was caused by the *A. phagocytophilum* antibody-positive dogs ($p < 0.001$, OR 0.25 [0.01–0.60]). Dogs with antibodies against *A. phagocytophilum* in addition had significantly more often an elevated body temperature ($> 39.5^\circ\text{C}$) than antibody-negative ones ($p = 0.002$, OR 6.39 [1.23–44.29]). In addition, dogs with antibodies against *A. phagocytophilum* showed more often a poor general condition than negatives ($p = 0.002$, OR 2.71 [1.40–5.30]).

There was no significant association between the presence of musculoskeletal system signs such as lameness, painful or swollen joint and the presence of antibodies to *B. burgdorferi* sl and/or *A. phagocytophilum*. Also concerning all other clinical signs, there were no differences between dogs of the negative and those of the positive group (Tab. 3).

There was also no statistical significant difference concerning laboratory values between the negative and the positive group. Dogs with antibodies to *A. phagocytophilum* tended to have more regularly ($p = 0.030$) monocytosis (16.8%) than dogs of the negative group (13.0%), but after Bonferroni correction, the difference was no longer significant (Tab. 4). None of the examined blood smears revealed intragranulocytic inclusions.

TABLE 3: Clinical abnormalities and diagnoses of dogs of the negative and the positive group as well as within the positive group (B +, A +, B/A +); antibody-positive for *B. burgdorferi* sl (B +), antibody-positive for *A. phagocytophilum* (A +), antibody-positive for both agents (B/A +); gastrointestinal (GI)

	Negative Group	Positive Group	p-value	B +	A +	B/A +	p-value (in case of a significant difference between the pos. and the neg. group)
Diagnosed as "healthy"	34/100	16/100	0.003	3/13	9/78	4/9	< 0.001 (A + versus neg.)
Poor general condition	29/100	47/100	0.001	4/13	41/78	2/9	0.002 (A + versus neg.)
Fever	2/100	13/100	0.007	0/13	9/78	2/9	0.002 (A + versus neg.)
Disease of the GI tract	13/100	14/100	1.000	1/13	13/78	0/9	
Disease of the urogenital tract	4/100	6/100	0.745	2/13	4/78	0/9	
Disease of the respiratory tract	2/100	2/100	0.613	0/13	1/78	1/9	
Diseases of the musculoskeletal system	0/100	3/100	0.244	2/13	1/78	0/9	
Disease of the central nervous system	4/100	9/100	0.251	3/13	6/78	0/9	
Disease of the cardiovascular system	5/100	4/100	1.000	2/13	2/78	0/9	
Skin disease	9/100	8/100	1.000	0/13	8/78	0/9	
Autoimmune disease	4/100	3/100	1.000	0/13	3/78	0/9	
Metabolic disease	7/100	7/100	0.781	1/13	6/78	0/9	
Neoplasia	13/100	18/100	0.434	1/13	14/78	3/9	
Others	15/100	16/100	1.000	2/13	14/78	1/9	

TABLE 4: Laboratory changes of dogs of the negative and the positive group as well as within the positive group (B +, A +, B/A +); antibody-positive for *B. burgdorferi* sl (B +), antibody-positive for *A. phagocytophilum* (A +), antibody-positive for both agents (B/A +), blood urea nitrogen (BUN)

	Negative group (number of dogs with the laboratory change)	Positive group (number of dogs with the laboratory change)	p-value	B +	A +	B/A +	p-value (in case of a significant difference between the pos. and the neg. group)
Leucopenia	4/100	7/100	0.535	1/13	4/78	2/9	
Leucocytosis	9/100	17/100	0.141	1/13	15/78	1/9	
Monocytosis	13/100	23/100	0.097	0/13	21/78	2/9	
Thrombocytopenia	6/100	9/100	0.591	1/13	7/78	1/9	
Anemia	9/100	15/100	0.276	1/13	13/78	1/9	
Elevated ALT activity	13/100	14/100	1.000	2/13	11/78	1/9	
Elevated AP activity	15/100	13/100	0.838	1/13	11/78	1/9	
Hyperbilirubinemia	8/100	7/100	1.000	1/13	6/78	0/9	
Hypalbuminemia	8/100	6/100	0.781	0/13	6/78	0/9	
Hyperproteinemia	4/100	6/100	0.745	1/13	3/78	2/9	
Elevated BUN	7/100	15/100	0.113	2/13	12/78	1/9	
Elevated creatinin	5/100	11/100	0.192	2/13	8/78	1/9	

Discussion

448 dogs in the Munich area that were presented to the Teaching Hospital for various reasons were randomly screened for the presence of specific antibodies to *B. burgdorferi* sl and *A. phagocytophilum*. This survey revealed a prevalence of 4.9% for antibodies to *B. burgdorferi* sl and 19.4% to *A. phagocytophilum*. Only 2% of dogs showed concurrently antibodies to both agents.

Obviously, infection rates of ticks with *B. burgdorferi* sl (4.9%) and *A. phagocytophilum* (19.4%) in the same area and the established prevalence in dogs behave reciprocal. In both *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* sl, vectors have to attach for up to 48 hours for successful transmission (Hodžić et al., 1998; Katavolos et al., 1998; Des Vignes et al., 2001). Thus, transmission time is similar and does not seem to be the reason for this imbalance. A possible explanation might be a faster and more efficient evasion of the immune system of the intracellular pathogen *A. phagocytophilum* in comparison to the extracellular *B. burgdorferi* sl (Krupka et al., 2007; Straubinger et al., 2008). This may lead more frequently to persistent infections in the case of *A. phagocytophilum*.

The detection rate of antibodies against *B. burgdorferi* sl in the present study was distinctly lower than in previous antibody surveys (Weber et al., 1991). This can be explained by using a highly specific test, the SNAP®4Dx® (IDEXX Laboratories Inc., USA). This test system is not affected by limitations of previous tests (whole-cell immune fluorescence assay [IFA], whole-cell enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]), including unspecific reactions, subjectivity in interpretation, or cross-reactivity with vaccine-induced antibodies. The SNAP®4Dx® assay uses a single, highly specific synthetic peptide (C₆) as capture antigen for *B. burgdorferi* sl. The C₆ peptide is part of the invariable region 6 (IR 6) within the VlsE protein. This region is highly conserved among different *B. burgdorferi* sl species and highly immunogenic in the canine host (Liang et al., 2000). There is no cross-reactivity to vaccine-induced antibodies or other spirochetes. Hence, the use of this diagnostic tool in the present study explains the lower prevalence than reported in older studies. The prevalence is similar to a recent antibody survey in Germany using the same diagnostic system (Krupka et al., 2007; Straubinger et al., 2008).

The detection rate of antibodies to *A. phagocytophilum* implicates, that nearly every fifth dog in the Munich area shows antibodies against this pathogen. However, this prevalence is also lower than in previous studies with detection rates of up to 50.1% (Barutski et al., 2006; Jensen et al., 2007) using IFA. The IFA could be less specific or the SNAP assay used in this study may be less sensitive. The latter however, is rather unlikely because recent data revealed a sensitivity of 99.1% of the SNAP®4Dx® assay for *A. phagocytophilum* antibody detection (Chandrasekar et al., 2010). The detection rates of the present study again is close to those of the recent German antibody survey (17.6% to 31.1%), in which mainly stored samples were randomly investigated with the same detection method (Krupka et al., 2007; Straubinger et al., 2008). Different study populations also could contribute to the differences in prevalence. The present study provides prevalence data in dogs presented to a veterinary hospital without any preselection.

Only 2.0% of dogs showed coexisting antibodies to both agents. Both pathogens share the same vector and coinfections have been assumed to be common (Nieto and Foley, 2008; Carrade et al., 2009). Hence, a higher prevalence would have been expected.

The age distribution was not significantly different between dogs of the positive (median six years) and those of the negative (median seven years) group. This is somehow astonishing as one might expect that more dogs become positive with older age as both infections are suspected to persist and likelihood of exposure increases with age.

Male dogs were significantly more often positive tested than female dogs. The reason for this is unknown. In human patients, men are also slightly more often affected of human granulocytic ehrlichiosis than women (Dumler et al., 2007b).

Bernese Mountain Dogs had significantly more often antibodies to *B. burgdorferi* sl ($p = 0.040$) and to both agents simultaneously ($p < 0.001$) than dogs of other breeds. The presumption that the greater surface area (Egenvall et al., 1997) or the long hair coat of Bernese Mountain Dogs could lead to an increased infestation with ticks and as a result to a prolonged pathogen contact does not seem to be an appropriate explanation; other large sized or long-hair coated breeds with equal outdoor activities did not have antibodies more com-

monly. These findings coincide with a study from Switzerland (Cerber et al., 2007), in which Bernese Mountain Dogs showed significantly more often antibodies to *B. burgdorferi* sl than large breed long-haired control dogs. Therefore, a breed predisposition can be presumed. The present study revealed that Bernese Mountain Dogs only have a higher risk to develop antibodies to *B. burgdorferi* sl (and in consequence to both agents) but not against *A. phagocytophilum* alone. Intensive breeding, like it is the case in Bernese Mountain Dogs, could be associated with a reduced defense against specific infectious diseases. The different pathogenic characters of both agents with *A. phagocytophilum* being an intracellular organism in contrast to *B. burgdorferi* sl leads to different reactions of the immune system following an infection. This may explain a difference in antibody response of Bernese Mountain Dogs against both agents.

Dogs with antibodies against *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* sl, or against both agents had significantly more often a history of tick exposure than negatively tested dogs. However, history of tick control or rural versus urban living environment, and travel history were not significantly different in positively versus negatively tested dogs. The assumption that living in rural areas with increased contact to woods and green areas may lead to an increased contact to tick-transmitted pathogens (Cerber et al., 2007) was not confirmed in this study. This might be explained by the numerous parks in the middle of the city of Munich. The fact that tick control was not different between the groups but tick infestation was, may lead to the conclusion that tick control was not effective. Not enough information in this specific context was collected but this could be an area in which more research may be required.

Dogs of the negative group were more often diagnosed as "healthy" than dogs with antibodies to *A. phagocytophilum*. In addition, dogs of the positive group were significantly less common presented for routine health care. An infection with *A. phagocytophilum* can result in neutropenia or impaired function of neutrophils. Hence, infections could predispose for secondary opportunistic infections (Carlyon and Fikrig, 2006; Bakken and Dumler, 2008). In ruminants, it is known that *A. phagocytophilum* decreases CD4⁺ and CD8⁺ peripheral blood counts, impairs mitogenic responses, antibody responses, and neutrophil emigration, and leads to defective phagocytosis and intracellular killing (Brodie et al., 1986; Lepidi et al., 2000; Dumler et al., 2005). Tissue injury as possible consequence of the host inflammatory response may also affect multiple organ systems (Lepidi et al., 2000; Dumler et al., 2007a) in dogs. Thus, *A. phagocytophilum* infection is thought to be related to disturbance of the host's inflammatory and immune system function (Dumler et al., 2005) and potentially alters the ability to react on other disease processes. However, even so the results of this study suggest that *A. phagocytophilum* infection may impair an infected dogs' health status, it was not possible to identify specific clinical signs (other than the unspecific sign fever) or laboratory changes attributable to *A. phagocytophilum* infection.

Dogs with antibodies against *A. phagocytophilum* also showed more often a poor general condition (41/78, $p = 0.002$) than negative dogs, which may also be a sign that the infection actually has some influence on the dogs' health. Dogs with antibodies against *A. phagocytophilum* also had more commonly an elevated

body temperature (9/78, $p = 0.002$). However, in 7/9 *A. phagocytophilum* antibody-positive dogs with fever in this study, a final diagnosis potentially explaining the elevated body temperature was found (one with ulcerative colitis, two with steroid responsive meningitis arteritis, one with pneumonia, one with monocytic leukemia, and one with babesiosis). In none of the dogs with elevated body temperature, morulae were identified. In a study with experimentally infected dogs (Egenvall et al., 1998), intragranulocytic morulae could be clearly detected in the acute febrile state. Another German study revealed morulae in ten of 18 dogs naturally infected with *A. phagocytophilum* (Kohn et al., 2008). Hence, the detection of intragranulocytic inclusions would be expected, if the fever would actually be caused by the *A. phagocytophilum* infection. This again leads to the assumption that the fever in those nine dogs was actually caused by other diseases and not by the *A. phagocytophilum* infection.

In this study, there were no significant differences in the presence of thrombocytopenia, leucopenia, or other hematological changes or changes in serum biochemistry between dogs with or dogs without antibodies to *A. phagocytophilum* and/or *B. burgdorferi* sl. The major suspected laboratory change in *A. phagocytophilum*-infected dogs would be thrombocytopenia. However, only 7/78 dogs with antibodies against *A. phagocytophilum* showed thrombocytopenia. In four of these dogs, other diseases likely were responsible for thrombocytopenia (one with babesiosis, two with neoplasia (monocytic leukemia, malignant lymphoma), one with pneumonia and disseminated intravascular coagulation). In the other three dogs, primary immune-mediated thrombocytopenia was suspected, but a role of *A. phagocytophilum* in these thrombocytopenias cannot be excluded. In a Swedish study with experimentally *A. phagocytophilum*-infected dogs, all dogs developed distinct hematological changes (Egenvall et al., 1998) including profound thrombocytopenia and moderate leucopenia. Other studies have also reported thrombocytopenia as a common laboratory finding (Greig et al., 1996; Poirout et al., 2005; Kohn et al., 2008). As there was no difference concerning the presence of thrombocytopenia and as in all thrombocytopenic dogs a cause for the thrombocytopenia could be detected, it can be clearly stated that most of the dogs in the present study did not show "typical" laboratory changes attributable to anaplasmosis.

Limitations of this study are the relatively small number of dogs with antibodies to *B. burgdorferi* sl and with antibodies to both agents simultaneously. This might alter the statistical evaluation of the results of those patient groups.

In conclusion, this study showed that nearly every fifth dog in the Munich area shows antibodies to *A. phagocytophilum* and that the detection rate for antibodies to *B. burgdorferi* sl and to both agents is much lower. Bernese Mountain Dogs seem to be predisposed to *B. burgdorferi* infection. Dogs with detectable antibodies to *A. phagocytophilum* showed more often a poor general condition and an elevated body temperature and were less frequently diagnosed as "healthy" than dogs without antibodies. None of the dogs showed clinical signs which can be considered as characteristic for a disease caused by *A. phagocytophilum* or *B. burgdorferi* sl.

This study suggests, however, that an infection with *A. phagocytophilum* may be able to influence the health

status of a dog, but infections with typical clinical and laboratory changes are rare, while an infection with *B. burgdorferi* sl had no influence on the clinical presentation of the patients.

Acknowledgement

Results of this study were partially presented at the German Internal Medicine and Clinical Pathology Conference, 31 January to 1 February, 2009 in Berlin, Germany.

We thank IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA for the support of the present study by providing the SNAP®4Dx® test system.

Conflict of interest: All authors declare that no conflict of interest exists.

References

- Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH (1994): Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA* 272: 212–218.
- Bakken JS, Dumler S (2008): Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 22: 433–448, viii.
- Baranton G, Seino G, Theodore G, Postic D, Dykhuizen D (2001): Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity. *Res Microbiol* 152: 149–156.
- Barutski D, de Nicola A, Zeziola M, Reule M (2006): [Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in Germany]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 119: 342–347.
- Baumgarten BU, Rollinghoff M, Bogdan C (1999): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *J Clin Microbiol* 37: 3448–3451.
- Blanco JR, Oteo JA (2002): Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 8: 763–772.
- Brodie TA, Holmes PH, Urquhart GM (1986): Some aspects of tick-borne diseases of British sheep. *Vet Rec* 118: 415–418.
- Busch U, Hizo-Touffal C, Boehmer R, Fingerle V, Nitschko H, Wilske B, Preac-Mursic V (1996): Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. *J Clin Microbiol* 34: 1072–1078.
- Carlyon JA, Fikrig E (2006): Mechanisms of evasion of neutrophil killing by *Anaplasma phagocytophilum*. *Curr Opin Hematol* 13: 28–33.
- Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE (2009): Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med* 23: 1129–1141.
- Chandrasekar R, Mainville CA, Beall MJ, O'Connor T, Eberts MD, Alleman AR, Gaunt SD, Broitschwerdt EB (2010): Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Am J Vet Res* 71: 1443–1450.
- Des Vignes F, Friesman J, Heffernan R, Schulze TL, Stafford KC, 3rd, Fish D (2001): Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 183: 773–778.
- Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS (2005): Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis* 11: 1828–1834.
- Dumler JS, Barat NC, Barat CE, Bakken JS (2007a): Human granulocytic anaplasmosis and macrophage activation. *Clin Infect Dis* 45: 199–204.
- Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS (2007b): Ehrlichiosis in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 45 Suppl 1: S45–S51.
- Egenvall A, Bjoersdorff A, Lilliehook I, Olsson Egenvall E, Karlstam E, Artursson K, Hedhammar A, Gunnarsson A (1998): Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *Vet Rec* 143: 412–417.
- Egenvall AE, Hedhammar AA, Bjoersdorff AI (1997): Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec* 140: 222–226.
- Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurti TJ, Munderloh UG, Wilske B (1999a): Epidemiological aspects of human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany. *Wien Klin Wochenschr* 111: 1000–1004.
- Fingerle V, Munderloh UG, Liagl G, Wilske B (1999b): Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol* 188: 145–149.
- Fritz CL, Kjemtrup AM (2003): Lyme borreliosis. *J Am Vet Med Assoc* 223: 1261–1270.
- Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Rausch CE (2007): Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. *BMC Vet Res* 3: 15.
- Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS (1996): Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol* 34: 44–48.
- Hodzie E, Fish D, Marzetti CM, de Silva AM, Fang S, Barthold SW (1998): Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *J Clin Microbiol* 36: 3574–3578.
- Jaulhac B, Heller R, Limbach FX, Hansmann Y, Lipsker D, Montell H, Sibilia J, Piemont Y (2000): Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with Lyme arthritis. *J Clin Microbiol* 38: 1895–1900.
- Jensen J, Simon D, Murua Escobar H, Soller JT, Bullerdiek J, Beolitz P, Pfister K, Nolte I (2007): *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health* 54: 94–101.
- Katavolos P, Armstrong PM, Dawson JE, Telford SR, 2nd (1998): Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 177: 1422–1425.
- Kohn B, Galko D, Beolitz P, Pfister K (2008): Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 22: 1289–1295.
- Krupka I, Pantchev N, Lorentzen L, Weise M, Straubinger RK (2007): Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland. *Prakt Tierärz* 88: 776–788.

- Lepidi H, Bunnell JE, Martin ME, Madigan JE, Stuenkel S, Dumler JS (2000): Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila* group infections. *Am J Trop Med Hyg* 62: 29–37.
- Liang FT, Jacobson RH, Straubinger RK, Grooters A, Philipp MT (2000): Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariant region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 38: 4160–4166.
- Littman MP (2003): Canine borreliosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33: 827–862.
- Noer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR (2002): Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 16: 309–315.
- Nieto NC, Foley JE (2008): Meta-analysis of coinfection and coexposure with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in humans, domestic animals, wildlife, and *Ixodes ricinus*-complex ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 93–101.
- Picken RN, Strle F, Picken MM, Ruzic-Sabljic E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Cimperman J (1998): Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *J Invest Dermatol* 110: 211–214.
- Piesman J, Gern I (2004): Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 129 Suppl: S191–220.
- Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK (2005): Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *J Clin Microbiol* 43: 796–801.
- Rauter C, Hartung T (2005): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a meta-analysis. *Appl Environ Microbiol* 71: 7203–7216.
- Straubinger RK, Straubinger AE, Harter I, Jacobson RH, Chang YE, Summers BA, Erb HN, Appel MJ (1997): *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. *Infect Immun* 65: 1273–1285.
- Straubinger RK, Krupka I, Pantchev N, Lorentzen L, Weise M (2008): Single and dual infections with *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in German dogs – a serological research study. Proceedings of the 3rd Canine Vector-Borne Disease (CVBD) Symposium 46–54.
- Stuenkel S (2007): *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun* 31 Suppl 1: 79–84.
- Von Loewenich FD, Baumgarten BU, Schroppel K, Geisendorfer W, Rollinghoff M, Bogdan C (2003): High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J Clin Microbiol* 41: 5033–5040.
- Weber A, Heim U, Schafer R (1991): [Incidence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in small animal practice in North Bavaria]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 104: 384–386.

Address for correspondence:

Prof. Dr. Katrin Hartmann
Medizinische Kleintierklinik
Clinic of Small Animal Medicine
LMU University of Munich
Veterinärstr. 13
80539 Munich
Germany
vorstandsassistenz@medizinische-kleintierklinik.de

IV. STUDIE II

Comparison of different diagnostic tools for the detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in dogs

Charlotte Barth¹

Reinhard K. Straubinger, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Ph.D.²

Inke Krupka, Dr. med. vet.²

Elisabeth Müller, Dr. med. vet.³

Carola Sauter-Louis, Dr. med. vet., Ph.D. (epidemiology), Dipl. ECVPH⁴

Katrin Hartmann, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA¹

¹Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

²Institute for Infectious Medicine and Zoonotic Diseases, LMU University of Munich, Germany

³LABOKLIN Veterinary Diagnostic Laboratory, Bad Kissingen, Germany

⁴Clinic for Ruminants with Ambulatory Clinic and Herd Health Management, LMU University of Munich, Germany

Veterinary Clinical Pathology, eingereicht (Einverständniserklärung zur Aufnahme in die Dissertation von allen Co-Autoren liegt vor)

COMPARISON OF DIFFERENT DIAGNOSTIC TOOLS FOR THE DETECTION OF *BORRELIA BURGDORFERI* ANTIBODIES IN DOGS

Charlotte Barth¹, Inke Krupka², Reinhard K. Straubinger², Elisabeth Müller³, Carola Sauter-Louis⁴, Katrin Hartmann¹

Short Title:

Borrelia antibody tests in dogs

¹Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

²Institute for Infectious Medicine and Zoonotic Diseases, LMU University of Munich, Germany

³LABOKLIN Veterinary Diagnostic Laboratory, Bad Kissingen, Germany

⁴Clinic for Ruminants with Ambulatory Clinic and Herd Health Management, LMU University of Munich, Germany

Correspondence:

Katrin Hartmann

Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

Veterinärstr. 13

80539 Munich

Vorstandsassistentz@medizinische-kleintierklinik.de

Key words:

immunofluorescence assay, kinetic enzyme-linked immunosorbent assay, Lyme borreliosis, SNAP[®]4Dx[®], Western blot

Abstract

Background: Antibody tests are frequently used in the diagnosis of canine Lyme borreliosis, including immunofluorescence assays (IFA), detecting immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) antibodies, kinetic enzyme-linked immunosorbent assays (KELA), and Western blot (WB). Recently, the SNAP[®]4Dx[®] test, an in-house test using C₆ technology, came on the market.

Objectives: Aim of the study was to compare different diagnostic tools, like IFA, KELA, SNAP[®]4Dx[®] test, and WB, and to determine sensitivity and specificity when compared to the gold standard WB.

Methods: Two hundred canine sera were tested for the presence of specific antibodies against *Borrelia* spp. with the above mentioned tests.

Results: Sensitivity and specificity of IFA-IgG was 76.6% (95% CI 46.87–86.72) and 87.1% (95% CI 80.06–91.90), respectively. Sensitivity and specificity of IFA-IgM was 26.3% (95% CI 11.81–48.79) and 81.0% (95% CI 73.64–86.71), respectively. Sensitivity and specificity of KELA was 100% (95% CI 83.18–100) and 75.4% (95% CI 67.02–82.09), respectively. Sensitivity and specificity of SNAP[®]4Dx[®] was 84.2% (95% CI 62.43–94.48) and 98.5% (95% CI 94.83–99.60), respectively. SNAP[®]4Dx[®] showed almost perfect agreement with WB results (kappa 0.847).

Conclusions: IFA-IgG and IFA-IgM had very low sensitivity and specificity and cannot be recommended to diagnose *Borrelia* spp. infections. KELA showed excellent sensitivity and can be recommended as screening test, but positive results require confirmation. SNAP[®]4Dx[®] had very good sensitivity and specificity and can replace the more labor-intensive WB, at least in untreated patients.

Introduction

Borrelia burgdorferi (*B. burgdorferi*), the agent of the tick-borne Lyme borreliosis, is a motile, helical-shaped bacteria belonging to the family *Spirochaetacea*.¹ For diagnosis of *Borrelia* spp.-induced infections, direct detection methods, including culture or polymerase chain reaction (PCR), as well as indirect detection methods, including different antibody detection techniques are used.¹

Culture of the organisms is hampered by substantial limitations, such as the need for special technical facilities, time-consuming, long incubation periods, and a low sensitivity.^{2,3,4} Furthermore, pretreatment with antibiotics readily impairs culture positivity, making this tool inappropriate for pretreated patients.⁵

PCR can be used for amplification of *B. burgdorferi* DNA and has a high sensitivity combined with an excellent specificity.⁶ However, positive results may be caused also by nonviable fragments of the organism.⁷ Furthermore, the load of the pathogen in clinical specimens, especially blood, is low, which increases the risk of false negative results especially in pre-treated patients. In conclusion, the usefulness of direct detection methods in clinical patients is limited.^{2,4}

Thus, antibody detection is most frequently performed in practice.^{2,3,8-10} The immunofluorescence assay (IFA) has been used widely to detect specific antibodies against *Borrelia* spp. However, IFA suffers from several limitations, including subjectivity in interpretation, lack of standardization, and possible cross-reactivity of the antibodies with other antigens, like heat shock proteins and flagellar antigens, with the consequence of frequent false positive results.⁴ Furthermore, IFA is incapable to differentiate between antibodies developed following vaccination and those after field infection.⁸ Despite these limitations, IFA are still performed in veterinary practice. Efforts to increase usefulness of IFA include differentiation of *Borrelia*-specific antibodies in immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) subclasses. However, in the diagnosis of canine Lyme borreliosis, the differentiation of IgM and IgG is not as helpful as in other infectious diseases, because IgG antibodies are already high when clinical signs associated with a *B. burgdorferi* infection occur or when chronic subclinical infections are present, and because IgM antibodies usually stay high over prolonged periods up to life-long.^{2,11-16}

ELISA methods are available in several modifications. Kinetic enzyme-linked immunosorbent assay (KELA) is a diagnostic method using whole-cell sonicates for the detection of *Borrelia* antibodies. KELA also carries limitations such as the possibility of cross-reactions and the inability to identify the source of immunoreactions (vaccination *versus* natural infection). Despite its limitations, KELA gains advantage over other immunoassays in regard to easier performance and the possibility of automatization.^{15,17}

A new diagnostic tool is the C₆ ELISA using a specific synthetic peptide. The 25-mer C₆ peptide is part of the invariable region 6 (IR 6) within the highly variable borrelial surface protein VlsE (variable major protein-like sequence, expressed). This region was shown to be highly conserved among different *B. burgdorferi* strains and highly immunogenic in the canine host^{18,19}. An in-house ELISA (SNAP[®]3Dx[®], SNAP[®]4Dx[®], IDEXX, Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) uses this single, highly specific synthetic peptide as capture antigen. There is no cross-reaction to vaccine-induced antibodies or infection with other spirochetes.^{18,20}

Western blot (WB), also called immunoblot, is considered the gold standard of antibody detection. WB allows the distinction between immunologic responses after vaccination and those after natural infection. Although the diagnostic value of WB is dependent on the subjective interpretation of the visually assessed band intensity²¹, and misinterpretation may lead to false positive results, WB is considered the confirmatory test of choice.^{22,23} The use of commercial WB using recombinant antigen allows a better standardization.²⁴

There are only few studies comparing selected available antibody testing methods. Therefore, the aim of this study was to compare different diagnostic tools for the detection of antibodies against *B. burgdorferi*, that are commonly used in veterinary practice, namely IFA, KELA, SNAP[®]4Dx[®] test, and WB and to determine sensitivity and specificity of IFA, KELA, and SNAP[®]4Dx[®] test when compared to the gold standard WB.

Materials and Methods

Dogs

Two hundred dogs that were presented to the Clinic of Small Animal Medicine of the LMU University of Munich, Germany, from October 2006 to February 2008 were prospectively included in the study. All animals were client-owned patients of different age, gender, and breed. Dogs were either healthy (presented for the yearly health check) or presented for various clinical signs. Dogs were included in which blood was taken for various reasons. Sera of all dogs were tested for the presence of antibodies to *B. burgdorferi* using IFA-IgM, IFA-IgG, KELA, SNAP[®]4Dx[®], and WB.

Antibody testing

IFA

Every serum specimen was screened for the presence of IgG and IgM antibodies with IFA (IFA slides from Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim, Germany). Sera were diluted serially in buffered saline and incubated for 30 minutes in the individual slide wells to allow reaction of patient antibody with the antigens. Slides were then washed to remove unbound serum proteins, and fluorescence-labeled anti-animal IgG (conjugate) was added followed by another incubation period of 30 minutes. The slides were washed again to remove unbound conjugate. The resulting reactions were visualized with standard fluorescence microscope. Positive reactions were seen as sharply defined apple-green fluorescent spirochetes; negative samples lacked the typical fluorescence. For the detection of IgG antibodies, a titer of <1:32 was considered negative, a titer of 1:64 was considered as equivocal, a titer of $\geq 1:128$ was considered positive. For the detection of IgM antibodies, a titer of <1:32 was considered negative, a titer of $\geq 1:32$ was considered positive.

KELA

The KELA was performed on 96-well-ELISA plates. Coating of the utilized 96-well-ELISA plates (C96 Maxisorb, Nunc, Wiesbaden, Germany) was done with a lysate antigen preparation (2.05 µg per well). Two 85 µl lysate antigen preparations (concentration of proteins 2.6 mg per ml) were diluted in 200 µl CO₃/ME/SDS and in a 200 µl quantity of recombinant OspA (Eurican® Merilym, Merial, Lyon, France), followed by a one minute incubation period at room temperature. Sixty-four ml of 0.1 M carbonate coating buffer were added and diluted over a time period of 15 minutes at room temperature. Fifty % of the wells were filled with the prepared lysate antigen solution in quantities of 100 µl each. The remaining wells were filled with 0.1 M carbonate coating buffer without lysate antigen solution in the same amount. These non antigen-containing wells served as controls. Plates were covered and incubated over night at 4°C. Until first use, plates were frozen at -20°C over a 24 hour period.

KELA performance and evaluation was based on a published protocol.¹² Before use, both coated 96-well-ELISA-plates and canine sera were defrosted at room temperature. Each plate contained also four canine sera as controls: one derived from an experimental infected dog, one from a dog with moderate antibody level, one from a dog with low antibody level, and one from a dog without detectable antibodies. Canine serum specimens were diluted in 1:100 PBS with 0.05% of Tween 20 and 2% milk powder (PBSTM). After automated four-time washing of the plates with PBST, 100 µl of the serum PBSTM solution were incubated for 1 hour at 37°C. After incubation, the plates were washed again. One hundred µl of 1:4000 diluted detection antibody anti-Dog-IgG-HRP (Cappel Research Products Durham, N.C., USA) were added to each well and incubated for 30 minutes at room temperature. The plates were washed again, and 100 µl of TMB was added to each well. The addition of the substrate was performed within 1 minute. Each plate was read 3 times at 650 nm at 45 sec intervals. To determine optical density, units established at Cornell University (Ithaca, New York, USA) were used. These units were correlated with the values of each plate, and a regression analysis was performed. Results (units, standard error) were comparable with the control sera. The cut off value was set as 100 units.

SNAP[®]4Dx[®]

Canine whole blood of all 200 dogs was tested for the presence of antibodies against *B. burgdorferi* using the SNAP[®]4Dx[®] (IDEXX, Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) ELISA following the manufactures instructions. Each test kit consists of a coated matrix with five blue spots in the result window. These spots contain specific peptides as antigens for the detection of antibodies against *B. burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*), and *Ehrlichia canis* (*E. canis*) and specific capture antibodies for the detection of *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) antigen. One spot serves as a positive control. After activation of the test kit, both the wash and substrate solution flow along the coated matrix.

The test was performed immediately after blood sampling using whole blood. The detection of antibodies to *A. phagocytophilum*, *E. canis*, and *D. immitis* antigen was not subject of this study.

WB

A commercially available WB based on *B. afzelii* lysate antigen preparation and recombinant VlsE (*Borrelia afzelii* + VlsE Eco Blot IgG Western blot, Genzyme Virotec GmbH, Rüsselsheim, Germany) was used. The test was performed according to manufactures instructions with adaption as follows. Canine serum diluted to 1:100 was incubated for 30 minutes with one WB strip. Strips were cleaned of organic residues by washing. One to 4000 diluted anti-dog-IgG-AP antibodies was incubated for 35 minutes with one strip. Strips were washed again after the incubation period. After addition of substrate (BCIP/NBT), color development on the test strip was visible after 16 to 20 minutes. The interaction of the substrate was stopped by adding aqua dest.

The following bands were assessed (the appropriate molecular weights are noted in parentheses (kDa)): p14 (14), p17 (17), p21 (21), OspC (23), p30 (30), p39 (39), p43 (43), p58 (58), p83/100 (83/100). The occurrence of at least two of the above mentioned bands as well as VlsE was defined as positive reaction for infection. The occurrence of a signal at 31 kDa (OspA) was classified as immunologic reaction following vaccination, potentially together with occurrence of OspB (34 kDa), p41, p83/100, OspC (23), and p21, the occurrence of the 31-kDa band in a naturally infected (not vaccinated) dog is uncommon.

Statistical Analysis

Data were analyzed using MS Excel (Microsoft Inc., Seattle, USA, 2010) and SPSS (version 19, IBM SPSS Inc, Armonk, New York, USA). Sensitivity, specificity, and predictive values, including their 95% confidence intervals, were calculated for each of the methods compared to the gold standard WB. Sensitivity calculation was performed by dividing the number of true positives by the number of true positives plus number of false negatives. Specificity calculation was performed by dividing the number of true negatives by the number of true negatives plus number of false positives. The positive predictive value (PPV) was defined by ratio of true positives to combined true and false positives. The negative predictive value (NPV) was defined by ratio of true negatives to combined true and false negatives. In calculation of sensitivity and specificity, equivocal values of IFA-IgG and KELA were excluded.

Agreement between different tests was assessed using kappa with the assessment of Landis and Koch.²⁵ Graphs of the results of different methods were done in SPSS using a logarithmic scale for the IFA-IgG.

Results

Results originated with specimens examined with all test systems

Results of all tested specimens of IgG-specific IFA and IgM-specific IFA, with KELA, SNAP[®]4Dx[®], and WB are listed in a table (Table 1). IgG titers (IFA) of positive animals ranged from 1:128 to 1:4096. Positive IgM titers (IFA) ranged from 1:32 to 1:64. Positive KELA values ranged from 100 to 781.5 units.

WB identified 21 of 200 animals as infected. Therefore, prevalence of infection was 10.5% in the tested population. Of the infected animals, 9.5% showed band patterns typical for an infection (without vaccination), and 1.0% showed band patterns typical for infection plus vaccination. In addition, 18.5% dogs had band patterns typical for immunoreaction following vaccination (without infection).

Three specimens were negative in the SNAP[®]4Dx[®] test, while WB showed band patterns typical for infection. One of these three dogs had an IFA-IgG titer of 1:32, IFA-IgM < 1:32, KELA = 628.6 units; the second had an IFA-IgG titer of 1:256, IFA-IgM 1:32, KELA = 127.3 units; the third specimen had an IFA-IgG titer of 1:1024, IFA-IgM < 1:32 and KELA = 570.3 units.

Of the three SNAP[®]4Dx[®] positively tested specimens without WB-confirmed infection, the first dog had an IFA-IgG titer of 1:32, IFA-IgM < 1:32, KELA = 167.8 units, the second showed bands typical for vaccination in the WB, IFA-IgG titer was 1:128, IFA-IgM 1:32, KELA = 515.4 units, and the third had an IFA-IgG titer of < 1:32, IFA-IgM < 1:32, KELA = 55.4 units.

Sensitivity, specificity (and 95% confidence intervals), PPV and NPV of the SNAP[®]4Dx[®], IFA-IgG and IFA-IgM, and KELA were calculated when compared to WB (Table 2). For calculation of sensitivity, specificity, PPV, and NPV, equivocal values of IFA-IgG and KELA were excluded.

Agreement of test systems

Agreement of the different test system was calculated using Kappa (Table 3). Agreement of quantitative values in IFA-IgG and KELA in relation to WB results is shown graphically (Figure 1).

Discussion

To compare different diagnostic tools for the detection of specific antibodies against *B. burgdorferi* in dogs, IFA-IgG, IFA-IgM, KELA, SNAP[®]4Dx[®], and WB were performed in 200 canine serum specimens. The *B. burgdorferi* infection rate within the study population, as determined by the gold standard WB, was 10.5%. There are no current prevalence studies using WB, but the prevalence revealed with the WB in the present study was identical to that determined by SNAP[®]4Dx[®]. Thus, prevalence studies using the SNAP[®]4Dx[®] are comparable, and the revealed prevalence of the present study is similar to those of a current German antibody survey using the SNAP[®]4Dx[®]. This survey involved 5881 canine serum samples. Antibody prevalence was dependent on the geographic area within Germany with the highest prevalence of 10.3%.²⁶ Further data from dogs within Europe reported distinctly lower antibody prevalences of 1.1% in France using the SNAP[®]4Dx[®].²⁷ Another study also using the SNAP[®]4Dx[®] reported an antibody prevalence from 1.0% to 11.6% in the United States, depending on the geographic area.^{28,29} Thus, antibody prevalence is high in the dog population in many parts of the world, mainly depending on the presence of the vector ticks, but it has to be emphasized that presence of antibodies indicate infection but not clinical disease.

As screening tests, IFA and KELA methods are commonly used in the diagnosis of Lyme borreliosis.^{10,30} Fifty-one of 200 serum specimens (25.5%) were tested positive for IgG antibodies to *B. burgdorferi* in IFA. The IFA-based antibody prevalence was expected to be higher due to the limitations of IFA as a diagnostic tool⁴; previous data even reported antibody prevalence in dogs in the same area of Germany of up to 95.0% using IFA in 2005.^{31,32} It is unclear, why in the previous study almost all tested dogs reacted with the IFA. Likely, the IFA used at that time had a very low specificity. Agreement of IFA-IgG with WB results in the present study was moderate (kappa value 0.451). Sensitivity of IFA-IgG was 76.6% (95% CI 46.87–86.72), and specificity was 87.1% (95% CI 80.06–91.90). Only 27.5% of the 51 IFA-IgG-positive specimens were confirmed as infected by

WB analysis. Twenty (39.2%) of the IFA-IgG-positive serum specimens showed band pattern typical for an immunoreaction following vaccination, and it is expected that the IFA reacts positively in vaccinated animals. However, in 17 IFA-IgG-positive dogs neither antibodies indicative for infection nor vaccination were seen in WB and thus, those samples have to be considered false positive. The low specificity can be explained by cross-reactions to other antigens, such as heat-shock proteins or flagellin of other spirochetal bacteria,¹⁸ e. g. *Leptospira*. Other possibilities to create false positive reactions are subjectivity in interpretation and lack of standardization. There were also a high number of false negative results. High background activity detected by IFA could possibly explain these false negative results. With IFA primarily intended as a screening test for the detection of antibodies against *B. burgdorferi*, the high number of false negative results is a major concern and makes this test unsuitable as diagnostic method.

Measurement of IgM antibodies by IFA showed only poor agreement (kappa value 0.058) with WB results. This might be expected because the here used WB detects IgG and not IgM antibodies. Thus, IFA-IgM sensitivity was very low with 26.3% (95% CI 11.84–48.79); IFA-IgM specificity was 81.0% (95% CI 73.6–86.7). In the diagnosis of human Lyme borreliosis, the detection of IgM antibodies is only recommended during the first weeks of infection,¹⁰ but even the detectability of antibodies in early stages of infection is highly dependent on individual immune responses.^{4,9} In canine Lyme borreliosis, most dogs show no signs of illness in the first weeks of infection, and *erythema migrans*, that is pathognomonic in human Lyme borreliosis, is not observed.³³ Thus, dogs are usually not presented early in infection, and the detection of IgM antibodies with its low sensitivity and specificity is not helpful and not recommended in the diagnosis of canine Lyme borreliosis.²

Agreement of KELA and WB was only moderate (kappa value 0.445), but KELA showed an excellent sensitivity of 100%. Thus, KELA detected all infected dogs. However, specificity of 75.4% (95% CI 67.0–82.1) was low. Like with IFA, false positive results can be caused by the presence of cross-reacting antigens, including common bacterial antigens, e. g., flagellar antigens. Moreover, sera of vaccinated dogs can react positively in KELA. However, 13 not infected, not vaccinated dogs were also positive. Interestingly, vaccinated animals showed a tendency to have higher KELA values than infected animals (Figure 1). Thus,

vaccination seems to produce a pronounced KELA antibody response. Agreement of KELA and SNAP[®]4Dx[®] was only fair within the study population (kappa = 0.235). Another study comparing a conventional ELISA with a commercially C₆ ELISA assay showed a better agreement (kappa = 0.571).³⁴ However, in this study a different conventional ELSIA was used and the study population mainly consisted of Bernese mountain dogs in which higher antibody prevalence is expected,³⁵ and this could influence the results. Due to its high specificity, KELA can be recommended as excellent screening test. Positive samples, however, always need confirmation.

The SNAP[®]4Dx[®] showed a high sensitivity and very good specificity with 84.2% and 98.5%, respectively. However, other data reported even higher sensitivity and specificity of 98.8% (95% CI 95.4–99.9) and 100% (95% CI 98.0–100) for the SNAP[®]4Dx[®].^{36,37} Three specimens with negative result in the SNAP[®]4Dx[®] were considered positive on WB. In contrast to other test systems, including WB, detectable antibodies against the C₆ peptide decline rapidly after initiation of antibiotic treatment.³⁸ This would be a possible explanation for the negative result in the SNAP[®]4Dx[®] in dogs with WB patterns typical for an infection. However, only one of these three animals had a confirmed history of recent antibiotic treatment. Other possibilities for the discrepant results may be that these were indeed false negative results in the SNAP[®]4Dx[®]. This raises the question if a single C₆ peptide is able to detect antibodies against all species, especially in view of the heterogeneity of *Borrelia* species in Europe. Data suggest that infections with different *Borrelia* genospecies are possibly not detected by C₆ ELISA in European patients.^{39,40} A recent study using a murine mouse model confirmed that IR6 is highly antigenetically conserved among strains of *B. burgdorferi* sensu stricto and *B. garinii*. It also showed that the C₆ ELISA had excellent sensitivity in the detection of antibodies against *B. burgdorferi* sensu stricto and *B. garinii*. However, the intensity of murine C₆ peptide immune response to *B. afzelii* seemed to be strain-dependent.⁴¹ Potentially, the three SNAP[®]4Dx[®]-negative dogs had a *B. afzelii* infection that was not detected. Another possibility would be that these dogs were not infected and that the WB results were actually false positive. This might be possible, as the WB is dependent on subjective interpretation of band intensity,⁴ and identification of diagnostic bands can be difficult due to nonspecific signals with similar molecular weight.

Three specimens were tested positive in the SNAP[®]4Dx[®] without WB-confirmed infection. One of the SNAP[®]4Dx[®]-positively tested dogs was identified as vaccinated with the WB. In other studies, none of vaccinated animals showed positive reaction in C₆ ELISA.^{18,42} A possible explanation for the SNAP[®]4Dx[®]-positive and WB-negative results could be an early antibody response.⁹ In experimentally infected dogs, animals showed a strong C₆ antibody response four to five weeks post infection, and 30.0% had detectable antibodies already three weeks post infection.¹⁸ In contrast, positive WB results were detected at five to eight weeks post infection.^{43,44} Thus, potentially the three SNAP[®]4Dx[®]-positive and WB-negative dogs (including the vaccinated one) had an early infection. This is also possible in the vaccinated dog, because vaccination does not necessarily protect from infection.⁴⁵

In conclusion, both IFA-IgG and IFA-IgM showed low sensitivity and specificity and cannot be recommended as diagnostic tests for the detection of antibodies against *B. burgdorferi*. KELA showed an excellent sensitivity, but an insufficient specificity. Thus, this method is an excellent screening test, but positive results require confirmation in a subsequent second step, e. g., with WB. The SNAP[®]4Dx[®] test showed an excellent agreement with WB testing, that currently is considered as gold standard. There were few discrepant results, but it is unclear, whether these are truly false negative or false positive SNAP[®]4Dx[®] test results, or if these results were rather discrepant due to shortcomings in the WB. Especially in the early phase of infection, the SNAP[®]4Dx[®] might have a higher sensitivity than the WB. However, it needs to be considered that the SNAP[®]4Dx[®] can show negative results in animals infected with *B. afzelii* and infected animals if treated with antibiotics. Nevertheless, in animals not pretreated with antibiotics, the SNAP[®]4Dx[®] is a first-rate in-house test to diagnose or to exclude *Borrelia* spp. infection.

Acknowledgements

We thank IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA for providing the SNAP[®]4Dx[®] test system for the study.

Disclosure: The authors declare that they have no financial interest and involvement in any company that manufactures products that are used and discussed in the present study. All authors declare that no conflict of interest exists.

References

1. Marques AR. Lyme disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2010;10:13–20.
2. Krupka I, Straubinger RK. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010;40:1103–1119.
3. Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2003;3:215–227.
4. Agüero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:484–509.
5. Nadelman RB, Nowakowski J, Forseter G, et al. Failure to isolate *Borrelia burgdorferi* after antimicrobial therapy in culture-documented Lyme borreliosis associated with erythema migrans: report of a prospective study. *Am J Med.* 1993;94:583–588.
6. Straubinger RK. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2191–2199.
7. Persing DH, Rutledge BJ, Rys PN, et al. Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. *J Infect Dis.* 1994;169:668–672.
8. Littman MP, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE. ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med.* 2006;20:422–434.
9. Steere AC, McHugh G, Damle N, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for Lyme disease. *Clin Infect Dis.* 2008;47:188–195.
10. Branda JA, Agüero-Rosenfeld ME, Ferraro MJ, Johnson BJ, Wormser GP, Steere AC. 2-tiered antibody testing for early and late Lyme disease using only an immunoglobulin G blot with the addition of a VlsE band as the second-tier test. *Clin Infect Dis.* 2010;50:20–26.
11. Appel MJ, Allan S, Jacobson RH, et al. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis.* 1993;167:651–664.
12. Toepfer KH, Straubinger RK. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. *Vaccine.* 2007;25:314–326.

13. Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, Appel MJ. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. J Clin Microbiol. 1997;35:111–116.
14. Magnarelli LA, Anderson JF, Schreier AB. Persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs of New York and Connecticut. J Am Vet Med Assoc. 1990;196:1064–1068.
15. Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10–20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis. 2001;33:780–785.
16. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet. 2012;379:461–473.
17. Wormser GP, Aguero-Rosenfeld ME, Nadelman RB. Lyme disease serology: problems and opportunities. JAMA. 1999;282:79–80.
18. Liang FT, Jacobson RH, Straubinger RK, Grooters A, Philipp MT. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 2000;38:4160–4166.
19. Liang FT, Philipp MT. Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun. 1999;67:6702–6706.
20. Levy SA. Use of a C6 ELISA test to evaluate the efficacy of a whole-cell bacterin for the prevention of naturally transmitted canine *Borrelia burgdorferi* infection. Vet Ther. 2002;3:420–424.
21. Robertson J, Guy E, Andrews N, et al. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. J Clin Microbiol. 2000;38:2097–2102.
22. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. J Infect Dis. 1993;167:392–400.
23. Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol. 1995;33:419–427.
24. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007;49:13–21.

25. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159–174.
26. Krupka I, Pantchev N, Lorentzen L, Weise M, Straubinger R. Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland. *Prakt Tierarzt*. 2007;88:776–788.
27. Pantchev N, Schaper R, Limousin S, Norden N, Weise M, Lorentzen L. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitol Res*. 2009;105 Suppl 1:S101–114.
28. Bowman D, Little SE, Lorentzen L, Shields J, Sullivan MP, Carlin EP. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. *Vet Parasitol*. 2009;160:138–148.
29. Beall MJ, Chandrashekar R, Eberts MD, et al. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8:455–464.
30. Fritz CL, Kjemtrup AM. Lyme borreliosis. *J Am Vet Med Assoc*. 2003;223:1261–1270.
31. Sum S, Hartmann K. Antikörperprävalenz gegen *Borrelia burgdorferi* in Süddeutschland [abstract]. *Tierärztl Prax*. 2005:142.
32. Weber A, Heim U, Schafer R. Incidence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in small animal practice in North Bavaria. *Berl Munch Tierärztl Wochenschr*. 1991;104:384–386.
33. Littman MP. Canine borreliosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2003;33:827–862.
34. Gerber B, Haug K, Eichenberger S, Reusch CE, Wittenbrink MM. Comparison of a rapid immunoassay for antibodies to the C6 antigen with conventional tests for antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in Europe. *Vet Rec*. 2009;165:594–597.

35. Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reusch CE. Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. BMC Vet Res. 2007;3:15.
36. Levy S, O'Connor TP, Hanscom JL, Shields P. Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status of dogs naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. Vet Ther. 2002;3:308–315.
37. Liang FT, Aberer E, Cinco M, et al. Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* SL. J Infect Dis. 2000;182:1455–1462.
38. Philipp MT, Bowers LC, Fawcett PT, et al. Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. J Infect Dis. 2001;184:870–878.
39. Gomes-Solecki MJ, Meirelles L, Glass J, Dattwyler RJ. Epitope length, genospecies dependency, and serum panel effect in the IR6 enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi*. Clin Vaccine Immunol. 2007;14:875–879.
40. Tjernberg I, Sillanpaa H, Seppala I, Eliasson I, Forsberg P, Lahdenne P. Antibody responses to *Borrelia* IR(6) peptide variants and the C6 peptide in Swedish patients with erythema migrans. Int J Med Microbiol. 2009;299:439–446.
41. Krupka I, Knauer J, Lorentzen L, O'Connor TP, Saucier J, Straubinger RK. *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe induce diverse immune responses against C6 peptides in infected mice. Clin Vaccine Immunol. 2009;16:1546–1562.
42. O'Connor TP, Esty KJ, Hanscom JL, Shields P, Philipp MT. Dogs vaccinated with common Lyme disease vaccines do not respond to IR6, the conserved immunodominant region of the VlsE surface protein of *Borrelia burgdorferi*. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11:458–462.
43. Chang YF, Novosel V, Chang CF, et al. Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*-infected ticks and treated with dexamethasone. Am J Vet Res. 2001;62:1104–1112.
44. Korshus JB, Munderloh UG, Bey RF, Kurtti TJ. Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto using *Ixodes scapularis* ticks

artificially infected by capillary feeding. *Med Microbiol Immunol.* 2004;193:27–34.

45. Toepfer KH, Straubinger RK. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent: A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. *Vaccine.* 2007;25:314–326.

Figure legend

FIGURE 1: Quantitative results in KELA and IFA-IgG in relation to WB results; the first vertical line gives the 1:64 titer as equivocal results, the second vertical line gives the 1:128 titer as positive results; the horizontal line illustrates the 100 KELA Units as the positive cut-off value;

immunofluorescence assay (IFA), Western blot (WB), kinetic enzyme-linked immunosorbent assay (KELA)

Tables

TABLE 1: Results of all 200 animals in the different test systems (IFA-IgG and IFA-IgM, KELA, SNAP®4Dx®) compared to the results in the gold standard WB. Twenty-one of 200 animals were identified as infected by WB, thus, prevalence of infection was 10.5% in this study;

positive (pos.), negative (neg.), immunofluorescence assay (IFA), immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin M (IgM), kinetic enzyme-linked immunosorbent assay (KELA), Western blot (WB)

	IFA-IgG pos. (n = 51)	IFA-IgG neg. (n = 127)	IFA-IgG equivocal (n = 22)	IFA-IgM pos. (n = 40)	IFA-IgM neg. (n = 160)	KELA pos. (n = 87)	KELA neg. (n = 101)	KELA equivocal (n = 12)	SNAP®4Dx® pos. (n = 21)	SNAP®4Dx® neg. (n = 179)
infected (in WB) (n = 21)	14	5	2	7	14	21	0	0	18	3
not infected (in WB) (n = 179)	37	122	20	33	146	31	101	12	3	176
infected, not vaccinated (in WB) (n = 19)	12	5	2	5	14	19	0	0	16	3
infected, vaccinated (in WB) (n = 2)	2	0	0	2	0	2	0	0	2	0
not infected, vaccinated (in WB) (n = 37)	20	11	6	6	31	33	3	1	1	36
not infected, not vaccinated (n = 179)	17	111	14	27	115	13	99	11	2	140

TABLE 2: Sensitivity, specificity (calculated with samples categorized with a WB as gold standard), negative and positive predictive values (and 95% confidence intervals) of IFA-IgG, IFA-IgM, KELA, and SNAP®4Dx®. Equivocal results in IFA-IgG and KELA were not included in the calculation of sensitivity, specificity, and predictive values, when compared to the gold standard WB;

positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), confidence interval (CI), immunofluorescence assay (IFA), immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin M (IgM), kinetic enzyme-linked immunosorbent assay (KELA)

	IFA-IgG	IFA-IgM	KELA	SNAP®4Dx®
Sensitivity (%)	76.6	26.3	100	84.2
	(95% CI 46.9–86.7)	(95% CI 11.8–48.8)	(95% CI 83.2–100)	(95% CI 62.4–94.5)
Specificity (%)	87.1	81.0	75.4	98.5
	(95% CI 80.1–91.9)	(95% CI 73.6–86.7)	(95% CI 67.0–82.1)	(95% CI 94.8–99.6)
PPV (%)	42.9	16.1	38	88.9
	(95% CI 26.5–60.9)	(95% CI 7.1–32.6)	(95% CI 25.9–51.6)	(95% CI 67.2–96.9)
NPV (%)	95.6	88.8	100	97.8
	(95% CI 90.1–98.1)	(95% CI 82.1–93.2)	(95% CI 96.1–100)	(95% CI 93.8–99.3)

TABLE 3: Agreement (kappa values) of the different performed test systems (IFA-IgG and IFA-IgM, KELA, SNAP®4Dx®, and WB). Kappa values were interpreted as follows: kappa < 0 = no agreement, kappa 0–0.19 = poor agreement, kappa 0.20–0.39 = fair agreement, kappa 0.40–0.59 = moderate agreement, kappa 0.60–0.79 = substantial agreement, kappa 0.80–1.00 = almost perfect agreement;

immunofluorescence assay (IFA), immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin M (IgM), kinetic enzyme-linked immunosorbent assay (KELA), Western blot (WB)

	IFA-IgG	IFA-IgM	KELA	SNAP®4Dx®	WB
IFA-IgG	-	0.119	0.409	0.506	0.451
IFA-IgM	0.119	-	0.044	0.106	0.058
KELA	0.409	0.044	-	0.235	0.445
SNAP®4Dx®	0.506	0.106	0.235	-	0.847
WB	0.451	0.058	0.445	0.847	-

FIGURES

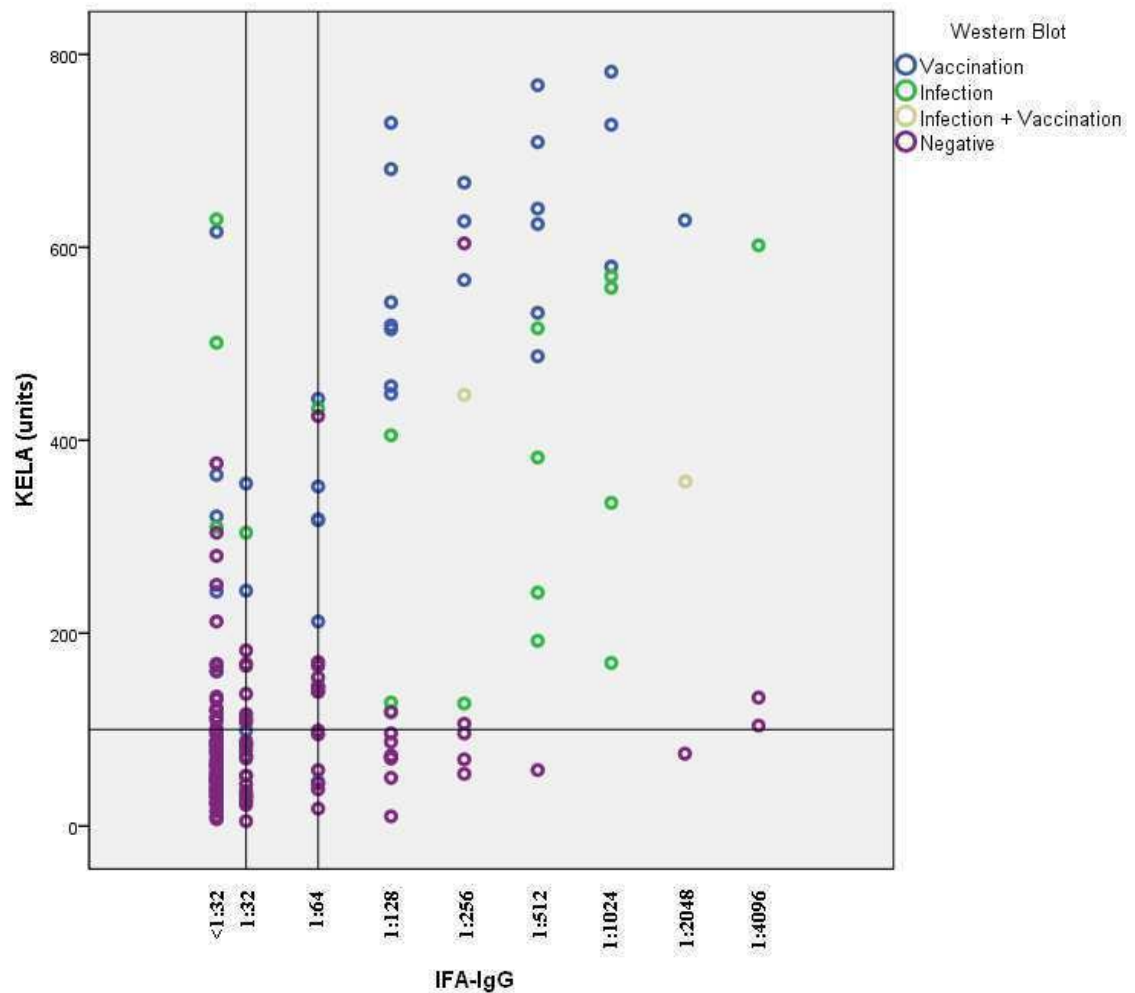
FIGURE 1: Quantitative results in KELA and IFA-IgG in relation to WB results.

The first vertical line gives the 1:64 titer as equivocal result, the second vertical line gives the 1:128 titer as positive result;

the horizontal line illustrates the 100 KELA Units as the positive cut-off value;

immunofluorescence assay (IFA), immunoglobulin G (IgG), kinetic enzyme-linked immunosorbent assay (KELA),

Western blot (WB)



V. **STUDIE III**

Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs

Charlotte Barth¹

Reinhard K. Straubinger, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., PhD²

Elisabeth Müller, Dr. med. vet.³

Carola Sauter-Louis, Dr. med. vet., Ph.D. (epidemiology), Dipl. ECVPH⁴

Katrin Hartmann, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA¹

¹Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

²Institute for Infectious Medicine and Zoonotic Diseases, LMU University of Munich, Germany

³LABOKLIN Veterinary Diagnostic Laboratory, Bad Kissingen, Germany

⁴Clinic for Ruminants with Ambulatory Clinic and Herd Health Management, LMU University of Munich, Germany

Veterinary Clinical Pathology, eingereicht (Einverständniserklärung zur Aufnahme in die Dissertation von allen Co-Autoren liegt vor)

COMPARISON OF DIFFERENT DIAGNOSTIC TOOLS FOR THE DETECTION OF *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* IN DOGS

Charlotte Barth¹, Reinhard K. Straubinger², Elisabeth Müller³, Carola Sauter-Louis⁴, Katrin Hartmann¹

Short Title:

Diagnostics for *Anaplasma phagocytophilum* in dogs

¹Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

²Institute for Infectious Medicine and Zoonotic Diseases, LMU University of Munich, Germany

³LABOKLIN Veterinary Diagnostic Laboratory, Bad Kissingen, Germany

⁴Clinic for Ruminants with Ambulatory Clinic and Herd Health Management, LMU University of Munich, Germany

Correspondence:

Katrin Hartmann

Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

Veterinärstr. 13

80539 Munich

Vorstandsassistentz@medizinische-kleintierklinik.de

Key words: anaplasmosis, canine, IFA, ELISA, SNAP[®]4Dx[®], PCR

Abstract

Background: *Anaplasma (A.) phagocytophilum* infection is common in dogs, but the best way to diagnose an infection is still not determined. Currently, antibody detection methods are frequently used in veterinary practice. In addition, polymerase chain reaction (PCR) is available for direct detection of the bacterium. It is still unknown, how well the different diagnostic methods correlate.

Objectives: Therefore, aim of the study was to compare two antibody tests, immunofluorescence test (IFA) and the in-house ELISA SNAP[®]4Dx[®], and to determine the correlation of these methods with PCR by evaluating the sensitivity and specificity of the antibody tests when compared to PCR as direct detection method.

Methods: Sera of 200 prospectively included dogs were tested for the presence of antibodies to *A. phagocytophilum* using IFA and SNAP[®]4Dx[®]. Direct detection of the organism in whole blood was performed with PCR. Sensitivity, specificity, and predictive values, including their 95% confidence intervals, were calculated for IFA and SNAP[®]4Dx[®] in relation to PCR.

Results: Sensitivity of both IFA and SNAP[®]4Dx[®] was 100% (95% CI 51.01 – 100). Specificity of IFA was 52.9% (95% CI 50.42 – 64.17), specificity of SNAP[®]4Dx[®] was 57.4% (95% CI 45.83 – 59.70). Agreement of both antibody tests was only fair (kappa 0.334).

Conclusions: With their excellent sensitivity, IFA and SNAP[®]4Dx[®] can be useful as screening methods. Their specificity, however, was low, and agreement between both antibody tests was insufficient. These could be false positive antibody test results or PCR could be false negative in many dogs that are actually infected.

Introduction

Anaplasma (A.) phagocytophilum, causative agent of the tick-borne canine granulocytic anaplasmosis, is a pleomorphic obligate intracytoplasmic Gram-negative bacterium belonging to the family *Anaplasmataceae*.¹

Granulocytes, mainly neutrophils but also eosinophils, are the main targets of this organism. *A. phagocytophilum* lives within the cytoplasm where it replicates in membrane-bound vesicles. Replication results in the formation of microcolonies, called “morulae”.²⁻⁴ In dogs, five genetic variants of *A. phagocytophilum* were detected, differentiated by one or two nucleotide differences in the 16S rRNA gene sequence at nucleotide positions 54, 84, 86, and 120.⁵ It is still unclear, to which extent the genetic variants affect the pathogenicity of different *A. phagocytophilum* strains,^{6,7} but recent data suggest strain-dependent differences in infection dynamics.⁸ It has been shown that *A. phagocytophilum* infection persists in dogs after experimental inoculation.⁸⁻¹⁰ The same is expected after natural infection, but this has not been proven in the field yet.^{11,12}

For detection of *A. phagocytophilum* infection, indirect methods, such as immunofluorescence tests (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), as well as direct methods, such as microscopy, culture, and polymerase chain reaction (PCR), are available.

In veterinary practice, antibody measurement by IFA or ELISA is frequently used for detection of *A. phagocytophilum* infection.¹³ However, during the acute phase of infection, antibody tests can reveal negative results, because during the short incubation period, antibody production lags behind the development of clinical disease.^{5,11,14,15} In addition, antibody detection techniques carry several limitations. Conventional whole-cell antigen-based IFA or ELISA methods suffer from potential cross-reaction with other rickettsial agents, including *Anaplasma (A.) platys* and *E. canis*.^{5,9,16,17} Especially in the case of IFA, significant interlaboratory differences caused by individual interpretation of the laboratory carrying out the test and the lack of objective cut-off values can make interpretation of test results difficult.¹³

Besides IFA and conventional whole cell ELISA, a recombinant p44/MSP2 ELISA (SNAP[®]4Dx[®], IDEXX, Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) became recently commercially available⁹. This test system uses the synthetic peptide derived from the immunodominant p44 major outer surface protein. It produces

fast results and can be used as an in-house practice test. However, also with this assay, possible cross-reactions with other closely related species, like *A. platys*, cannot be excluded.^{9,18}

For the direct detection of *A. phagocytophilum*, culture, microscopic examination, as well as PCR are available. If cultivation of the bacterium is successful, infection with *A. phagocytophilum* is proven. However, culture with specialized recipient cells (mammalian or tick origin) is usually not available in commercial laboratories and takes up to several weeks to provide reliable results. Further, prior treatment with antibiotics can decrease sensitivity, making this technique difficult in pre-treated patients.⁴ Thus, benefit of culture as diagnostic tool is limited.

Evidence of morulae in stained peripheral blood smears is indicative of an acute infection with *A. phagocytophilum*. Morulae were detectable from day four to day 14 after inoculation in one study in experimentally infected dogs,¹⁹ while in another canine model, morulae were only present on day 10 and 11 post infection.⁸ Thus, morulae are not even detected in every acute *A. phagocytophilum* infection, and sensitivity of this method is low.¹¹ In addition, detection of these inclusion bodies is not specific because morulae can also result from infection with other *Ehrlichia* spp., including *E. ewingii* and *E. canis*.⁶

PCR for detection of *A. phagocytophilum* is a sensitive and specific method.^{11,14} PCR is able to detect the organism already in early stages of infection. Studies in experimentally infected dogs revealed positive PCR results as early as two days post infection.⁸ PCR stayed positive in experimentally infected dogs up to day 20 post infection in one study and was still positive at the end of the study period on day 60 in another study, respectively.^{8,19} In immunosuppressed animals, PCR even remained positive for up to several weeks.¹⁰ However, detection of the organism *via* PCR is dependent on the number of circulating pathogen, which can periodically differ during infection. Thus, some infected animals may show negative PCR results.^{10,19-21}

There are no studies so far comparing the diagnostic value of the IFA and the SNAP[®]4Dx[®] for detection of antibodies against *A. phagocytophilum*, or one of these two test systems with PCR. Thus, the aim of the study was to compare two antibody testing methods, IFA and SNAP[®]4Dx[®], and to determine how well these indirect detection methods correlate with PCR results by evaluating sensitivity

and specificity of IFA and SNAP[®]4Dx[®] when compared to PCR as direct detection method.

Materials and Methods

Dogs

Two hundred dogs that were presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine of the LMU University of Munich, Germany, from October 2006 to February 2008 were prospectively included in the study. All animals were client-owned patients of different age, gender, and breed. Dogs were either healthy (presented for a yearly health check) or were presented for various clinical sings. Sera of all dogs were tested for the presence of antibodies to *A. phagocytophilum* using IFA and the SNAP[®]4Dx[®] test. For direct detection of the organism, ethylene-diamine-tetraacetic-acid (EDTA) anticoagulated blood of every dog was tested by PCR.

Antibody testing

Each single serum specimen was screened for the presence of *Anaplasma*-specific antibodies by IFA and the SNAP[®]4Dx[®].

IFA

IFA was used to detect specific antibodies to *A. phagocytophilum*. IFA slides were obtained from Sekisui Virotech GmbH (Rüsselsheim, Germany). IFA uses whole organisms grown in cell culture as the source of antibodies as described earlier.^{22,23} Serial dilutions of serum were incubated for 30 min at 37°C followed by a washing step of three times 5 min in PBS buffer. In a second step, slides were incubated with FITC conjugate (Sigma-Aldrich GmbH, Germany) in an earlier established working solution for 30 min at 37°C with subsequent washing procedure as described earlier.^{22,23} Evaluation was performed microscopically; a titer of < 1:40 was considered negative, a titer of \geq 1:40 was considered positive for the presence of antibodies to *A. phagocytophilum*.

SNAP[®]4Dx[®]

Whole blood was tested immediately after collection for the presence of antibodies against *A. phagocytophilum* with the SNAP[®]4Dx[®] (IDEXX, Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) ELISA following the manufactures instructions. Each test kit consists of a coated matrix with five blue spots in the

result window. These spots contain specific peptides as antigens for the detection of antibodies against *A. phagocytophilum*, *Borrelia (B.) burgdorferi*, and *Ehrlichia (E.) canis* and specific capture antibodies for the detection of *Dirofilaria (D.) immitis* antigen. One spot serves as a positive control. After activation of the test kit, both the wash and substrate solution flow along the coated matrix. The detection of antibodies to *B. burgdorferi*, *E. canis* and *D. immitis* antigen was not subject of this study.

PCR

DNA was extracted from 200 µl EDTA blood using a commercial kit (BioSprint® 15 DNA Blood Kit, Qiagen, Germany) according to manufacturer's instructions. All DNA extracts were subjected to a fluorescent probe-based real-time PCR protocol specific for the *groEL* gene of *A. phagocytophilum*. PCR was performed in a 20 µl-reaction volume containing 10 µl Taqman® 2 x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Germany), 1 µl of a 20 x Custom Taqman® gene expression assay (Applied Biosystems, Germany) comprising primers and probe, and 9 µl of the extracted sample DNA. Amplification consisted of an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 35 cycles of denaturing (95°C for 15 s) and annealing/extension (60°C for 30 s) using the real-time PCR device Rotorgene 6000 (Qiagen, Germany). Each PCR run included negative controls to exclude the presence of contaminants as well as positive controls to validate the test. Absence of PCR inhibitors was proven by use of a published internal control system for each DNA sample.²⁴

Statistical Analysis

Data were analyzed using MS Excel (Microsoft Inc., Seattle, USA, 2010) and SPSS (version 19, IBM SPSS Inc, Armonk, New York, USA). Sensitivity, specificity, and predictive values, including their 95% confidence intervals, were calculated for the antibody detection methods, IFA and SNAP®4Dx®. In this study, PCR as direct detection method was used to determine infection status. Sensitivity calculation was performed by dividing the number of true positives by the number of true positives plus number of false negatives. Specificity calculation was performed by dividing the number of true negatives by the number of true negatives plus number of false positives. The positive predictive

value (PPV) was defined by the ratio of true positives to combined true and false positives. The negative predictive value (NPV) was defined by the ratio of true negatives to combined true and false negatives.

Differences in IFA levels between dogs with positive and negative results in the SNAP[®]4Dx[®] and between dogs with positive and negative result in PCR were statistically analyzed using Mann-Whitney-U test. Significance level was $p < 0.05$. Agreement between IFA and SNAP[®]4Dx[®] was assessed using kappa with the assessment of Landis and Koch.²⁵

Results

Results of all tested specimens in IFA, SNAP[®]4Dx[®], and PCR are listed in Table 1.

Prevalence of infection

PCR identified the presence of *A. phagocytophilum* in 4 of 200 animals. Therefore, prevalence of PCR-positive dogs was 2.0% in the tested population. Antibody prevalence as detected by IFA was 48.0% (96/200). Antibody prevalence as detected by SNAP[®]4Dx[®] was 43.5% (87/200).

Sensitivity, specificity, PPV, and NPV of antibody tests

Sensitivity, specificity (and 95% confidence intervals), PPV, and NPV of IFA and SNAP[®]4Dx[®], when compared to PCR for the detection of *A. phagocytophilum* infection, are listed in Table 2. All infected dogs detected by PCR had antibodies in IFA as well as in the SNAP[®]4Dx[®]. Therefore, sensitivity and NPV of IFA and SNAP[®]4Dx[®] was 100%.

Agreement between antibody tests

Seventy-six dogs had negative results in both antibody tests. Fifty-nine dogs had positive results in both antibody tests. Thirty-seven dogs had negative results in the SNAP[®]4Dx[®] and positive result in the IFA. Twenty-eight dogs had positive result in the SNAP[®]4Dx[®] and negative result in the IFA.

Agreement of the two antibody detection methods was evaluated using Kappa calculation. Kappa values were interpreted as follows: < 0 = no agreement; 0.0 – 0.19 = poor agreement; 0.20 – 0.39 = fair agreement; 0.40 – 0.59 = moderate agreement; 0.60 – 0.79 = substantial agreement, 0.80 – 1.0 = almost perfect agreement. IFA and SNAP[®]4Dx[®] showed fair agreement (Kappa value 0.334).

IFA titers

Positive IFA titers ranged from 1:40 to 1:5120 (Table 3). The four PCR-positive dogs had IFA titers of 1:320, 1:640, 1:1280, and 1:5120. Median IFA titers of PCR-positive dogs was 1:1000, median IFA value of PCR-negative dogs was “negative”. Median IFA titers of SNAP[®]4Dx[®]-positive dogs was 1:40, of SNAP[®]4Dx[®]-negative dogs was “negative”. Dogs with positive PCR results had significantly higher IFA titers than dogs with negative PCR result ($p = 0.001$).

Dogs with positive SNAP[®]4Dx[®] test results had significantly higher IFA titers than dogs with negative result in the SNAP[®]4Dx[®] ($p < 0.001$).

PCR-positive dogs

All four PCR-positive dogs had clinical signs. The first dog was diagnosed with pneumonia. This dog showed mild thrombocytopenia ($129.000 \cdot 10^9/l$) and neutrophilia with left shift. The second dog had acute gastroenteritis with no laboratory abnormalities. The third dog was diagnosed with a gastric foreign body. Besides vomiting, there were no clinical or laboratory abnormalities in this dog. The fourth dog had not only a positive *A. phagocytophilum* antibody test, this dog also tested positive for *E. canis* antibodies in the SNAP[®]4Dx[®]. An *E. canis* PCR was performed which revealed a negative result. The dog had a recent travelling history (Spain). It was presented with severely reduced general condition, fever, and pale mucous membranes. The dog also had a marked thrombocytopenia ($15.000 \cdot 10^9/l$), mild anemia and anti-platelet antibodies. It was euthanized due to worsening of the clinical conditions combined with financial constraints of the owners.

Discussion

The aim of this study was to compare different diagnostic tools for the detection of *A. phagocytophilum* in dogs, including IFA, SNAP[®]4Dx[®], and PCR, by investigating 200 blood samples from individual dogs. The prevalence of direct *A. phagocytophilum* detection within the study population, as determined by PCR, was 2.0%. A recent study evaluating *A. phagocytophilum* infection in dogs in Northeast Germany revealed a slightly higher prevalence of *A. phagocytophilum* infection by PCR of 5.7%. In that study, there was no significant difference in PCR results between sick dogs in which anaplasmosis was suspected (n = 258) and healthy dogs (n = 264).²⁶ Data of a group in the USA, however, found only 3.0% PCR-positive dogs in healthy animals (n = 222), but 37.0% PCR-positive dogs among suspected clinical cases (n = 51).²⁰ When comparing those two studies, it appears that *A. phagocytophilum* infection seems to be much more common in diseased dogs than in healthy ones in the USA, while this difference is not present in Germany. This could indicate that *A. phagocytophilum* strains in the USA are more virulent than the strains circulating in Germany, leading more commonly to clinical signs. Indeed in humans, symptomatic infection in European patients seems to be rarer and less severe than those in North America.^{2,27}

In the present study, all PCR-positive dogs had positive results in both antibody tests, the IFA and the SNAP[®]4Dx[®]. Thus, both antibody tests had excellent sensitivity (IFA and SNAP[®]4Dx[®] sensitivity 100%, 95% CI 51.01 – 100). Consequently, based on these data, both tests could be considered excellent screening tests and useful for exclusion of an infection with *A. phagocytophilum*. However, different antibody detection methods have been shown to fail to detect antibodies in very early infection;^{5,11,14,15} depending on the method, antibodies were detected not before eight to 30 days after experimental infection with *A. phagocytophilum*.^{8,9,19} A study in naturally infected dogs even reported that in 26.7% of PCR-positive dogs, no antibodies could be detected by IFA.²⁶ Certainly, one limitation of the present study is that the number of PCR-positive dogs is very low and thus, the excellent sensitivity has to be interpreted with respect to the low number of infections detected by PCR.

Specificity of both antibody detection methods was low when compared to PCR (IFA, 52.9% (95% CI 50.42 – 64.17), SNAP[®]4Dx[®] 57.4% (95% CI 45.83 – 59.70)). There are several explanations for the low specificity. Cross-reactions with other related agents, like *A. platys* or *E. ewingii*, may lead to false positive

results.^{9,18} However, neither *A. platys* nor *E. ewingii* is endemic in Germany^{26,28-30} and the majority of the dogs in the study population had no recent travel history. More likely, these results reflect previous contact to *A. phagocytophilum* leading to persisting antibody response. Duration of detectable antibodies in naturally infected dogs is still debated. In one study with experimentally infected dogs, antibodies were still detectable at the end of the study period of 4 months.¹⁰ After field infection, antibodies seem to be detectable even longer; while in one study antibodies detected by IFA declined below detection limit after 4 months, in another study, antibodies were still detectable after 12 months.^{5,12} One recent study followed SNAP[®]4Dx[®] results in four *A. phagocytophilum*-infected dogs. The four infected dogs became negative in the SNAP[®]4Dx[®] after 22, 25, 28, and 36 months.¹¹ In human patients, antibodies can even persist for at least three years.³¹ The relevance of persisting antibodies, however, is still unclear. Only if infection would persist lifelong, a positive result in antibody detection methods would also prove active infection. The true duration of infection, however, has not been fully evaluated in field infection, neither in treated, nor in untreated dogs. Thus, the high number of antibody-positive dogs in the present study could actually represent dogs that are still infected or it could represent dogs with previous antigen contact without active infection. On the other hand, it is unclear, how long bacteremia exists in naturally infected dogs and how long the agent is truly detectable by PCR after field infection. In human granulocytic anaplasmosis, bacteremia was reported to exist no longer than 28 days.³¹ However, data of experimentally infected dogs showed persistence of *A. phagocytophilum* DNA detectable by PCR in peripheral blood for at least 60 days,⁸ and another investigation even revealed long-time positive PCR results of up to six month after experimental inoculation in dogs undergoing immunosuppressant treatment.¹⁰ On the other hand, it might be possible that during natural infection, PCR results are only intermittently positive despite presence of *A. phagocytophilum*. This can be possible if bacterial load in the blood is very low.^{10,19-21} And in this case, antibody detection would actually be the better tool to diagnose a persisting *A. phagocytophilum* infection. Thus, the question if the antibody tests are truly false positive could only be answered if antibodies would be detected in SPF dogs that never had exposure to *A. phagocytophilum*. Interestingly, agreement between both antibody detection methods IFA and SNAP[®]4Dx[®] was only fair (Kappa value 0.334). Sixty-five results did not agree.

Thirty-seven dogs were IFA-positive but SNAP[®]4Dx[®]-negative; twenty-eight dogs were IFA-negative but SNAP[®]4Dx[®]-positive. IFA is a whole-cell detection method while the SNAP[®]4Dx[®] uses synthetic peptides. This can explain why specificity of the IFA with 52.9% (95% CI 50.42 – 64.17) was lower than that of SNAP[®]4Dx[®]. The 37 IFA-positive, SNAP[®]4Dx[®]-negative dogs had significantly lower IFA titers than the SNAP[®]4Dx[®]-positive dogs (Table 3). Only seven SNAP[®]4Dx[®]-negative dogs had an IFA titer greater or equal than 1:80. Thus, cross-reactivity of the IFA in dogs with low titers is most likely. Other reasons for false positive reactions in IFA in general are subjectivity in interpretation and lack of standardization. Differences in detection time point could be another explanation for the low agreement of both antibody tests in dogs in early stage of infection. The results of an experimental study using both antibody detection methods showed that antibodies were detected earlier with IFA (10 to 14 days) than with SNAP[®]4Dx[®] (17 to 30 days post inoculation).⁸ However, manufacturers data reported that the SNAP[®]4Dx[®] was able to detect *A. phagocytophilum* antibodies as soon as eight days post experimentally infection.³² There also may be differences in how long after infection antibodies can be detected by the two different methods, but this is not known to date. Finally the SNAP[®]4Dx[®]-negative, IFA-positive dogs could be explained by the cut-off of the SNAP[®]4Dx[®] that might only detect antibodies above a certain level. However, although most SNAP[®]4Dx[®]-negative dogs had IFA titer of 1:40 (see Table 3), some had much higher titers, indicating really false negative SNAP[®]4Dx[®] or false positive IFA results.

Results of a study from the SNAP[®]4Dx[®] manufacturer IDEXX, Laboratories Inc. (Westbrook, ME, USA) assessing agreement of IFA and SNAP[®]4Dx[®] revealed almost perfect agreement of both antibody tests ($\kappa = 0.990$).³² It is very difficult to explain, why the results of the present study contradict the results presented by IDEXX. The low agreement between both antibody detection methods rather supports the conclusion that many false positive results can occur in both methods.

Dogs with positive PCR results had significantly higher IFA values than dogs with negative PCR result ($p = 0.001$), and all PCR-positive dogs had titers $\geq 1:320$. This may indicate that low IFA titers are rather caused by unspecific reactions and are not diagnostic for infection. The difference in titers of PCR-positive and PCR-negative dogs can be considered as an advantage of the IFA

methods compared to the SNAP[®]4Dx[®], because SNAP[®]4Dx[®] only reveals positive or negative results without quantification. If the IFA cut-off value would be set at a titer of $\geq 1:80$, specificity of the IFA would have been much higher.

All four dogs with positive PCR were sick; however, in all three of the four dogs, clinical signs could be explained by another disease unrelated to the *A. phagocytophilum* infection. One dog with positive PCR had respiratory symptoms caused by severe pneumonia that likely cause disseminated intravascular coagulation causing mild thrombocytopenia. Although mild respiratory symptoms have infrequently been described in canine *A. phagocytophilum* infections⁵ and are also described in human infections,³³ other causes for the respiratory symptoms in this dog are much more likely. In the second dog with acute gastroenteritis, as well as in the third dog with gastric foreign body, all clinical signs can be explained by the other disease and no findings were consistent with anaplasmosis. The fourth dog did not only have antibodies to *A. phagocytophilum* in the SNAP[®]4Dx[®] as well as in IFA (in addition to the positive *A. phagocytophilum* PCR), it also had antibodies to *E. canis*. All clinical and laboratory findings of this dog could be explained by ehrlichiosis. The dog had travelled to Spain which would make infection with *E. canis* likely. However, *E. canis* PCR was negative and *A. phagocytophilum* PCR is very specific for *A. phagocytophilum* and does not detect *E. canis*. In addition, the *A. phagocytophilum* IFA titer in this dog was very high (1:5120). Thus, it is possible that the *E. canis* antibody test result was a false positive result; e. g., a cross-reaction with *A. phagocytophilum* antibodies, and that the dog actually only was infected with *A. phagocytophilum*. This however, is not that likely because the SNAP[®]4Dx[®] *Ehrlichia* analyte is known to have excellent specificity of 100%.^{5,34,35} Potentially, the dog had infection with both pathogens and thus, it is not clear whether the clinical and laboratory findings are caused by *A. phagocytophilum* or rather by *E. canis* infection. Clinical and laboratory findings in both infections can be very similar.

The major limitation of this study is that the comparison was performed between methods detecting antibodies on the one hand and PCR detecting the *A. phagocytophilum* DNA on the other hand. Kinetics of *A. phagocytophilum* infection and not shortcomings of the antibody detection methods may be the reason for the antibody-positive, PCR-negative dogs. This makes results difficult to interpret. However, there is no currently accepted gold standard for the

detection of *A. phagocytophilum* infection, and thus, a direct detection method (in this case PCR) was chosen. Another limitation is the low number of PCR-positive dogs making assessment of the specificity of the two antibody tests difficult.

In conclusion, the two antibody detection methods IFA and SNAP[®]4Dx[®] showed excellent sensitivity (100%). Thus, they can be useful as screening tests to rule out *A. phagocytophilum* infection. If used as initial test, the SNAP[®]4Dx[®] has advantages over IFA methods due to its easy and fast in-house performance. Specificity of both antibody tests when compared to PCR was low (IFA 52.9%, SNAP[®]4Dx[®] 57.4%) and agreement between both antibody tests was bad. It is unclear however, whether these were all false positive results or whether rather the PCR displayed false negative results in dogs that were truly infected.

Acknowledgements

We thank IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA for providing the SNAP[®]4Dx[®] test system for the study.

Disclosure: The authors declare that they have no financial interest and involvement in any company that manufactures products that are used and discussed in the present study. All authors declare that no conflict of interest exists.

References

1. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:2145–2165.
2. Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, et al. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1828–1834.
3. Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol*. 2010;167:108–122.
4. Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med*. 2010;30:261–292.
5. Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *J Clin Microbiol*. 2005;43:796–801.
6. Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med*. 2009;23:1129–1141.
7. Silaghi C, Kohn B, Chirek A, et al. Relationship of molecular and clinical findings on *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. *J Clin Microbiol*. 2011;49:4413–4414.
8. Scorpio DG, Dumler JS, Barat NC, et al. Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11:223–229.
9. Chandrashekar R, Mainville CA, Beall MJ, et al. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Am J Vet Res*. 2010;71:1443–1450.

10. Egenvall A, Lilliehook I, Bjoersdorff A, et al. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet Rec.* 2000;146:186–190.
11. Eberts MD, Vissotto de Paiva Diniz PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2011;47:86–94.
12. Egenvall AE, Hedhammar AA, Bjoersdorff AI. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec.* 1997;140:222–226.
13. Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med.* 2002;16:309–315.
14. Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol.* 1996;34:44–48.
15. Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med.* 2008;22:1289–1295.
16. Nicholson WL, Comer JA, Sumner JW, et al. An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1510–1516.
17. Suksawat J, Hegarty BC, Breitschwerdt EB. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med.* 2000;14:50–55.
18. Diniz PP, Beall MJ, Omark K, et al. High prevalence of tick-borne pathogens in dogs from an Indian reservation in northeastern Arizona. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10:117–123.
19. Egenvall A, Bjoersdorff A, Lilliehook I, et al. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *Vet Rec.* 1998;143:412–417.

20. Beall MJ, Chandrashekar R, Eberts MD, et al. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8:455–464.
21. Granick JL, Armstrong PJ, Bender JB. *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc.* 2009;234:1559–1565.
22. Walls JJ, Aguero-Rosenfeld M, Bakken JS, et al. Inter- and intralaboratory comparison of *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2968–2973.
23. Comer JA, Nicholson WL, Olson JG, Childs JE. Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center. *J Clin Microbiol.* 1999;37:558–564.
24. Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods.* 2006;136:200–209.
25. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159–174.
26. Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci.* 2011;91:71–76.
27. Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:763–772.
28. Dyachenko V, Pantchev N, Balzer HJ, Meyersen A, Straubinger RK. First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasit Vectors.* 5:49.
29. Menn B, Lorentz S, Naucke TJ. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors.* 2010;3:34.
30. Hamel D, Rohrig E, Pfister K. Canine vector-borne disease in travelled dogs in Germany--a retrospective evaluation of laboratory data from the years 2004-2008. *Vet Parasitol.* 2011;181:31–36.
31. Bakken JS, Dumler S. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2008;22:433–448.

32. Chandrashekar R, Mainville C, Daniluk D. Performance of an in-clinic test, SNAP 4Dx, for the detection of antibodies to canine granulocytic infection, *Anaplasma phagocytophilum* [abstract]. J Vet Intern Med. 2008:820.
33. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis. 2007;45 Suppl 1:S45–51.
34. Plier ML, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Kidd LB. Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. J Am Anim Hosp Assoc. 2009;45:232–238.
35. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol. 1998;36:2645–2651.

Tables

TABLE 1: Results of all 200 animals in the two different antibody assays (IFA and SNAP®4Dx®) compared to the PCR results. Four of 200 animals were identified as infected by PCR; thus, prevalence of direct *A. phagocytophilum* detection was 2.0 % in this study;

positive (pos.), negative (neg.), immunofluorescence assay (IFA), polymerase chain reaction (PCR), *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*)

	IFA	IFA	SNAP®4Dx®	SNAP®4Dx®
	pos.	neg.	pos.	neg.
<i>A. phagocytophilum</i>				
detected by PCR	4	0	4	0
(n = 4)				
<i>A. phagocytophilum</i> not				
detected by PCR	92	104	83	113
(n = 196)				
total	96	104	87	113
(n = 200)				

TABLE 2: Sensitivity, specificity, negative and positive predictive values (and 95 % confidence intervals) of IFA and SNAP®4Dx®, when compared to the PCR as direct detection method;

positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), confidence interval (CI), immunofluorescence assay (IFA), polymerase chain reaction (PCR)

	IFA	SNAP®4Dx®
Sensitivity (%)	100	100
	(95% CI 51.01 – 100)	(95% CI 51.01 – 100)
Specificity (%)	52.9	57.4
	(95% CI 50.42 – 64.17)	(95% CI 45.83 – 59.70)
PPV (%)	4.2	4.6
	(95% CI 1.80 – 11.23)	(95% CI 1.63 – 10.23)
NPV (%)	100	100
	(95% CI 96.68 – 100)	(95% CI 96.04 – 100)

TABLE 3: IFA titers in animals with positive and negative PCR and in animals with positive and negative SNAP[®]4Dx[®] results, respectively. Dogs with positive PCR results had significantly higher IFA values than dogs with negative PCR result ($p = 0.001$); dogs with positive SNAP[®]4Dx[®] test results had significantly higher IFA values than animals with negative result in the SNAP[®]4Dx[®] ($p < 0.001$);

immunofluorescence assay (IFA), polymerase chain reaction (PCR)

IFA titer	PCR	PCR	SNAP [®] 4Dx [®]	SNAP [®] 4Dx [®]
	pos.	neg.	pos.	neg.
	(n = 4)	(n = 196)	(n = 87)	(n = 113)
negative	0	105	29	76
1:40	0	56	26	30
1:80	0	3	1	2
1:320	1	12	10	3
1:640	1	9	9	1
1:1280	1	9	10	0
1:2560	0	1	1	0
1:5120	1	1	1	1

VI. DISKUSSION

Diese Arbeit umfasst drei Studien, die sich mit der Prävalenz, klinischen Relevanz und Diagnostik von Infektionen mit *B. burgdorferi* und *A. phagozytophilum* bei Hunden beschäftigten.

In der ersten Studie „Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum*, and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany“ wurden 448 Hunde randomisiert auf das Vorliegen spezifischer Antikörper gegen die von Zecken übertragenen Erreger *B. burgdorferi* sl und *A. phagozytophilum* untersucht. In dieser Population, die aus unterschiedlichen Patienten der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München bestand, wurde für das Vorliegen von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* eine Prävalenz von 4,9 % ermittelt. Die Prävalenz für das Vorliegen von Antikörpern gegen *A. phagozytophilum* lag bei 19,4 %. Antikörper gegen beide Erreger konnten bei 2,0 % der Hunde nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen einer anderen aktuellen Studie, die die Prävalenz von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* sl und *A. phagozytophilum* bei Hunden deutschlandweit untersuchte (KRUPKA et al., 2007).

Auffällig war, dass sich die ermittelte Antikörperprävalenz bei Hunden gegensätzlich zu der Infektionsrate bei Zecken in Süddeutschland verhielt. Überlegungen, dass Unterschiede in der Übertragungszeit zu dieser Differenz führen könnten, sind nicht zielführend, denn beide Erreger benötigen gleichermaßen einen Zeitraum von etwa 48 Stunden, um effektiv vom Vektor auf das Säugetier übertragen zu werden (HODZIC et al., 1998; KATAVOLOS et al., 1998; DES VIGNES et al., 2001). Eher könnten Unterschiede in der Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion mit beiden Erregern eine Rolle spielen. So ist es denkbar, dass *A. phagozytophilum* als intrazellulärer Erreger das Immunsystem eines Wirtes schneller und effizienter umgeht als das extrazelluläre Bakterium *B. burgdorferi* sl (STRAUBINGER et al., 2008).

Die Prävalenz von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* sl in der vorliegenden Studie war deutlich geringer als die einer früheren Studie aus dem Raum Bayern. In dieser früheren Studie hatten 35,5 % der Hunde Antikörper gegen den Erreger

(WEBER et al., 1991). Die Verwendung unterschiedlicher Testsysteme ist eine Erklärung für diese Differenz. In der vorliegenden Studie wurde mit dem SNAP®4Dx® (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) ein Testsystem verwendet, das ein einzelnes, hochspezifisches synthetisches Peptid, das C₆-Peptid zur Antikörperdetektion nutzt. Diese Methode hat wichtige Vorteile gegenüber anderen Tests wie Immunfluoreszenztests oder ELISA-Methoden, die auf Vollzell-Präparationen als Detektionsantigene basieren. So kommt es beim SNAP®4Dx® nicht zu Kreuzreaktionen mit impfinduzierten Antikörpern oder Infektionen mit anderen Spirochäten. Weiterhin liefert der SNAP®4Dx® als qualitativer, einfach handzuhabender Test eindeutige Ergebnisse. Dies ist ebenfalls ein großer Vorteil, insbesondere gegenüber Immunfluoreszenztests, bei denen die Subjektivität in der Beurteilung die Interpretation von Testergebnissen erschwert.

In der zweiten Studie („Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs“), in der anhand von 200 Hundesera verschiedene Testsysteme zum Antikörpernachweis von *B. burgdorferi* sl verglichen wurden, konnten diese Vorteile des SNAP®4Dx® bestätigt werden. Der SNAP®4Dx® zeigte hier eine hohe Sensitivität (82,4 %) und Spezifität (98,5 %). Andere Studien ermittelten sogar eine noch höhere Sensitivität (98,8 %) und Spezifität (100 %) für dieses Testsystem (LIANG et al., 2000a; LEVY et al., 2002) beim Nachweis von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* sl.

Der SNAP®4Dx® lieferte hier bei nur sechs Hunden Ergebnisse, die sich von denen des Western blots, der als Gold Standard zur Detektion von *Borrelia*-Antikörpern gilt, unterschieden. Drei SNAP®4Dx®-negative Hunde wurden im Western blot als infiziert beurteilt. Antikörper gegen das C₆-Peptid, das der SNAP®4Dx® nutzt, sinken zeitnah nach antibiotischer Therapie. Diese Reaktion auf Antibiotika kann mit anderen Antikörpertests, einschließlich des Western blots, nicht nachgewiesen werden (PHILIPP et al., 2001). Es wäre also denkbar, dass diese drei Hunde infolge einer antibiotischen Therapie ein negatives SNAP®4Dx®-Ergebnis hatten, während der Western blot noch immer infektionsspezifische Bandenmuster zeigte. Eine bestätigte und dokumentierte Vorbehandlung mit Antibiotika konnte jedoch nur bei einem Hund nachvollzogen werden. Es wäre ebenfalls denkbar, dass diese drei Hunde tatsächlich falsch negative Ergebnisse im SNAP®4Dx® hatten. Es gibt Hinweise, dass Infektionen

mit einigen *Borrelia*-Genospezies mit dem C₆-ELISA möglicherweise nicht detektiert werden (GOMES-SOLECKI et al., 2007; TJERNBERG et al., 2009). Dies ist insbesondere bei europäischen Patienten bedeutsam, da in Europa im Vergleich zu Nordamerika eine Vielzahl an heterogenen *Borrelia*-Spezies existiert (PIESMAN & GERN, 2004). Eine aktuelle Studie an einem Maus-Infektionsmodell zeigt, dass die invariable region 6 (IR₆), deren Teil das C₆-Peptid ist, innerhalb *B. burgdorferi* ss und *B. garinii* antigenetisch ausgesprochen stabil ist. Die Intensität der C₆-Immunreaktion der Mäuse auf eine Infektion mit *B. afzelii* scheint vom Borrelien-Stamm abhängig zu sein (KRUPKA et al., 2009). Zwar sind diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Hund übertragbar, dennoch wäre eine mögliche Erklärung für die Tiere mit negativem SNAP[®]4Dx[®]-Ergebnis und positivem Western blot, dass diese Hunde mit *B. afzelii* infiziert waren und diese Infektion durch den SNAP[®]4Dx[®] nicht detektiert wurde. Möglich wäre auch, dass das Ergebnis des SNAP[®]4Dx[®] bei diesen Tieren korrekt, aber das Western-blot-Ergebnis falsch positiv war. Die Interpretation der Bandenintensität des Western blots ist vom jeweiligen Untersucher abhängig und daher subjektiv (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). Außerdem kann die Identifikation von diagnostischen Banden durch unspezifische Signale mit gleichem Molekulargewicht erschwert werden. Daher wäre es durchaus denkbar, dass bei diesen Hunden ein falsch positives Western blot-Ergebnis zu der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des SNAP[®]4Dx[®] und des Western blot führte.

Drei weitere Hunde hatten ein positives Ergebnis im SNAP[®]4Dx[®], während diese Hunde im Western blot als nicht infiziert beurteilt wurden. Bei einem dieser Tiere wurden impfspezifische Banden detektiert, und auch laut Vorbericht war der Hund geimpft worden. Andere Studien berichten aber, dass kein geimpftes Tier im SNAP[®]4Dx[®] positiv reagierte (LIANG et al., 2000b; O'CONNOR et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für diese diskrepanten Ergebnisse wäre eine sehr frühe C₆-Antikörperreaktion (STEERE et al., 2008). In Studien mit experimentell infizierten Hunden konnte bereits vier bis fünf Wochen nach Infektion eine deutliche C₆-Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Dreißig Prozent der Tiere hatten sogar bereits drei Wochen nach Infektion nachweisbare Antikörper im C₆-ELISA (LIANG et al., 2000b). Positive Ergebnisse im Western blot konnten jedoch erst fünf bis acht Wochen nach Infektion nachgewiesen werden (CHANG

et al., 2001; KORSHUS et al., 2004). Daher wäre es möglich, dass diese drei Hunde eine frühe Infektion hatten, die zwar schon mit dem SNAP®4Dx®, aber noch nicht mit dem Western blot nachgewiesen werden konnte. Dies kann auch für den geimpften Hund zutreffen, da eine Impfung nicht unbedingt vollständig vor einer Infektion schützt (TOEPFER & STRAUBINGER, 2007).

Zusätzlich zum SNAP®4Dx® wurden in der zweiten Studie auch die Antikörpertestmethoden IFA (für IgG und IgM) und ein kinetischer ELISA (KELA) auf ihre Sensitivität und Spezifität sowie auf ihre Übereinstimmung mit dem SNAP®4Dx® und dem Western blot als Gold Standard untersucht. Diese beiden Tests werden in der Tiermedizin häufig als Screening-Tests in der *Borrelia*-Diagnostik verwendet.

Im IFA IgG reagierten 51 von 200 Blutproben positiv. Dies entspricht einer Prävalenz von 25,5 %. Tatsächlich wurden aufgrund der bekannten Limitationen des IFA (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005) eher noch höhere Werte erwartet. Eine Studie aus dem Jahr 2005 ergab eine mit dem IFA gemessene Antikörperprävalenz von bis zu 95 % in der Region München (SUM & HARTMANN, 2005). Warum in dieser früheren Arbeit nahezu alle Tiere im IFA positiv reagierten, ist unklar. Vermutlich hatte der dort verwendete IFA eine sehr geringe Spezifität. Die Ergebnisse des IFA IgG stimmten nur moderat mit denen des Gold Standards Western blot überein (Kappa 0,451). Die Sensitivität des IFA IgG war 76,6 % (95 % CI 46,87 – 86,72), die Spezifität war 87,1 % (95 % CI 80,06 – 91,90). In nur 27,5 % der im IFA IgG positiv getesteten Blutproben wurde tatsächlich eine Infektion mit dem Western blot bestätigt. 20 der IFA-IgG positiven Proben zeigten im Western blot typische Bandenmuster für eine Immunreaktion nach Impfung. Es war zu erwarten, dass auch geimpfte Hunde positiv im IFA IgG reagieren, da dieser Test auf Vollzell-Antigenpräparationen basiert und daher nicht in der Lage ist, die Quelle der Immunreaktion zu unterscheiden. Dennoch konnten bei 17 Hunden weder Antikörper nach Impfung noch nach Infektion mit dem Western blot detektiert werden. Diese positiven IFA-IgG-Ergebnisse müssen also als tatsächlich falsch positiv angesehen werden. Die geringe Spezifität kann auf Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen zurückzuführen sein, wie z. B. Hitzeschockproteine oder Flagellin anderer Bakterien wie beispielsweise Leptospiren (LIANG et al., 2000b). Zudem können die Subjektivität in der Beurteilung dieser Untersuchungsmethode sowie deren

fehlende Standardisierung zu falsch positiven Ergebnissen führen. Es gab zudem auch viele falsch negative Ergebnisse. Das könnte durch eine hohe Hintergrundaktivität bei der Auswertung des IFA zu erklären sein. Obwohl der IFA IgG insbesondere als Screening-Test in der Diagnostik von *Borrelia*-Infektionen verwendet wird, geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass er als solcher nicht geeignet ist.

Weiterhin wurde in der Studie ein IFA IgM durchgeführt. Dieser zeigte eine schlechte Übereinstimmung mit dem Western blot (Kappa 0,058). Dieses Ergebnis war erwartungsgemäß, denn der hier verwendete Western blot basierte auf der Detektion von IgG-Antikörpern. Folglich war auch die Sensitivität des IFA IgM gering (26,3 %, 95 % CI 11,84 – 48,79), ebenso die Spezifität (81,0 %, 95 % CI 73,6 – 86,7). In der Humanmedizin wird die Bestimmung von IgM-Antikörpern in der Diagnostik einer frühen *Borrelia*-Infektion verwendet (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). Hunde jedoch zeigen in den ersten Wochen einer Infektion keine klinischen Symptome, insbesondere das beim Menschen pathognomonische *Erythema migrans* wird beim Hund nicht beobachtet (LITTMAN, 2003). Folglich werden Hunde in der Regel nicht in frühen Infektionsstadien vorgestellt; die Untersuchung auf IgM-Antikörper beim Hund ist daher insbesondere mit der geringen Sensitivität und Spezifität nicht zu empfehlen (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

Als weiterer Test wurde der KELA untersucht. Zwar stimmten die KELA-Ergebnisse nur eingeschränkt mit dem Western blot überein (Kappa 0,445), dieser Test zeigte aber eine exzellente Sensitivität von 100 % und erkannte jedes infizierte Tier. Die Spezifität des KELA war allerdings gering (75,4 %; 95 % CI 67,0 – 82,1). Die Ursachen dieser geringen Spezifität sind mit denen des IFA vergleichbar; auch der KELA ist ein Vollzell-Antigen-basierender Test. Und auch im KELA führen Immunreaktionen nach Impfungen zu positiven Ergebnissen. Dennoch gab es auch mit dieser Methode 13 positiv getestete Hunde, die laut Western blot weder geimpft noch infiziert waren. Auch mit dem SNAP® 4Dx® stimmte der KELA nur mäßig überein (Kappa 0,235), obwohl eine ältere Studie eine bessere Übereinstimmung (Kappa 0,571) dieser beiden Methoden zeigte (GERBER et al., 2009). In dieser Studie wurde allerdings auch ein anderer konventioneller ELISA verwendet, und die Studienpopulation bestand hauptsächlich aus Berner Sennenhunden, bei denen eine höhere

Antikörperprävalenz erwartet wird (GERBER et al., 2007). Diese Faktoren könnten für die Diskrepanz mitverantwortlich sein. Anhand der hier ermittelten hohen Sensitivität des KELA kann dieser Test, im Gegensatz zum IFA, als guter Screening-Test empfohlen werden. Allerdings müssen positive Ergebnisse durch eine weitere Testmethode, wie beispielsweise durch den Western blot, bestätigt werden.

In der ersten Studie („Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum*, and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany“) wurde neben der Antikörperprävalenz gegen *B. burgdorferi* auch die Prävalenz von *A. phagozytophilum* untersucht. Es wurde gezeigt, dass nahezu jeder fünfte Hund in der Region München Antikörper gegen dieses Bakterium hatte. Die bereits genannte aktuelle deutschlandweite Prävalenzstudie zeigte auch bezüglich der Anaplasmen-Antikörper vergleichbare Ergebnisse. Je nach Region hatten 17,6 % bis 31,1 % der Hunde Antikörper gegen *A. phagozytophilum* (KRUPKA et al., 2007). Im Vergleich zu anderen Studien ist die Prävalenz der vorliegenden Studie jedoch deutlich geringer. Diese älteren Studien beschreiben Antikörperprävalenzen von bis zu 50,1 % (BARUTZKI et al., 2006; JENSEN et al., 2007). Die Antikörper in diesen Studien wurden mit Immunfluoreszenztests nachgewiesen. Die Verwendung unterschiedlicher Testsysteme kann sicherlich auch im Falle von *A. phagozytophilum* eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanzen sein.

Daher wurden in der dritten Studie dieser Arbeit („Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Anaplasma phagocytophilum*“) unterschiedliche Testsysteme zum Nachweis von *A. phagozytophilum* verglichen, der IFA und der SNAP[®]4Dx[®] als Tests zum Nachweis von Antikörpern sowie eine PCR als direkte Nachweismethode. Hierfür wurden Blutproben von 200 Hunden untersucht. Als Gold Standard diente hierbei die PCR als direkte Nachweismethode. Die Tatsache, dass indirekte und direkte Nachweismethoden verglichen wurden, war eine der Hauptlimitationen dieser dritten Studie. Da jedoch bisher kein etablierter Gold Standard in der Diagnostik von *A. phagozytophilum* existiert, wurde die PCR als direkte Nachweismethode des Erregers als Gold Standard ausgewählt.

In dieser Studie zeigten beide Testsysteme zum Nachweis von Antikörpern (IFA und SNAP[®]4Dx[®]) eine exzellente Sensitivität von 100 % (95 % CI 51,01 – 100).

Mittels Gold Standard PCR wurden nur vier der 200 untersuchten Hunde als infiziert entdeckt (Prävalenz 2,0 %). Alle vier Hunde hatten Antikörper, sowohl im IFA wie auch im SNAP®4Dx®. Betrachtet man diese exzellente Sensitivität von IFA und SNAP®4Dx®, dann können beide Tests sehr gut als Screening-Methoden angesehen werden und eignen sich daher gut, eine Infektion mit *A. phagozytophilum* auszuschließen. Die exzellente Sensitivität der beiden Antikörpernachweismethoden muss in der vorliegenden Studie aber sicherlich unter dem Aspekt betrachtet werden, dass nur eine sehr geringe Anzahl an Hunden ein positives PCR-Ergebnis hatten.

Die Spezifität beider Antikörpernachweismethoden war, berechnet in Bezug auf die PCR, gering (IFA 52,9 %; 95 % CI 50,42 – 64,17; SNAP®4Dx® 57,4 %; 95 % CI 45,83 – 59,70). Für diese Ergebnisse gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen können Kreuzreaktionen mit anderen nah verwandten Erregern wie *A. platys* oder *E. ewingii* zu falsch positiven Ergebnissen führen (CHANDRASHEKAR et al., 2010; DINIZ et al., 2010). Allerdings sind weder *A. platys* noch *E. ewingii* endemisch in Deutschland (MENN et al., 2010; HAMEL et al., 2011; KOHN et al., 2011; DYACHENKO et al., 2012), und die Mehrzahl der Hunde in der Studienpopulation hatte keinen aktuellen Reisevorbericht. Viel wahrscheinlicher ist, dass diese Hunde in der Vergangenheit Kontakt zu *A. phagozytophilum* hatten und diese Ergebnisse aus persistierenden Antikörpern resultieren. Tatsächlich ist es noch unklar, wie lange Antikörper nach einer Infektion mit Anaplasmen persistieren. Dies gilt insbesondere für natürlich infizierte Hunde. Bei experimentell infizierten Hunden waren Antikörper in einer Studie noch bis zum Studienende nach vier Monaten nachweisbar (EGENVALL et al., 2000). Nach natürlicher Infektion scheinen Antikörper jedoch noch bis zu mindestens einem Jahr nachweisbar zu sein (EGENVALL et al., 1997; POITOUT et al., 2005). Beim Menschen scheinen Antikörper sogar über mehrere Jahre hinweg zu persistieren (BAKKEN & DUMLER, 2008). Die Bedeutung persistierender Antikörper jedoch ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Ein Nachweis von Antikörpern würde nur dann eine aktive Infektion nachweisen, wenn diese Infektion lebenslang persistieren würde. Die tatsächliche Dauer einer Infektion ist aber insbesondere bei feldinfizierten Hunden nicht vollständig bekannt. Die Persistenz ist auch unabhängig von einer eventuell erfolgten Therapie. So könnte also die große Anzahl an Hunden mit Antikörpern gegen *A.*

phagozytophilum eine noch bestehende Infektion widerspiegeln oder aber diese Hunde hatten in der Vergangenheit Kontakt mit dem Erreger, ohne nach wie vor aktiv infiziert zu sein.

Wie lange eine Bakteriämie besteht und auch mit einer PCR nachweisbar ist, ist bei natürlich infizierten Tieren ebenfalls nicht sicher bekannt. Beim Menschen wird angenommen, dass die Bakteriämie nicht länger als 28 Tage besteht (BAKKEN & DUMLER, 2008). Bei experimentell infizierten Hunden waren jedoch noch nach bis zu 60 Tagen PCR-Untersuchungen aus Blut positiv (SCORPIO et al., 2011). Immunsupprimierte Hunde zeigten sogar noch nach mindestens sechs Monaten eine positive Blut-PCR (EGENVALL et al., 2000). Es muss bei diesen Überlegungen jedoch auch bedacht werden, dass PCR-Untersuchungen trotz Anwesenheit des Erregers negative Ergebnisse liefern können. Denn die Anzahl an Erregern im Blut kann im Verlauf einer Infektion schwanken und zeitweilig gering sein (EGENVALL et al., 1998; EGENVALL et al., 2000; BEALL et al., 2008; GRANICK et al., 2009). In diesen Fällen wäre die Untersuchung auf spezifische Antikörper die bessere Methode, um eine persistierende Infektion mit *A. phagozytophilum* nachzuweisen. Die Frage, ob Antikörpertests tatsächlich so viele falsch positive Ergebnisse liefern, könnte nur beantwortet werden, wenn in Spezifisch pathogen freien (SPF) Tieren Antikörper nachgewiesen würden, die niemals in Kontakt mit dem Erreger gekommen waren.

Weiterhin ist aber zu bedenken, dass in sehr frühen Infektionsstadien Tests zum Nachweis von Antikörpern (wie IFA und SNAP[®]4Dx[®]) negative Ergebnisse liefern können (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008; EBERTS et al., 2011). Je nach verwendetem Testsystem konnten bei experimentell infizierten Hunden Antikörper ab Tag 8 und Tag 30 *post infectionem* nachgewiesen werden (EGENVALL et al., 1998; CHANDRASHEKAR et al., 2010; SCORPIO et al., 2011). Die Übereinstimmung zwischen IFA und dem SNAP[®]4Dx[®] zum Nachweis von Antikörpern gegen *A. phagozytophilum* war nur mäßig (Kappa 0,334). Bei 65 Hunden stimmten die Ergebnisse der beiden Tests nicht überein. Siebenunddreißig waren positiv im IFA, aber negativ im SNAP[®]4Dx[®]; 28 Tiere waren negativ im IFA und positiv im SNAP[®]4Dx[®]. Die schlechte Übereinstimmung könnte unter anderem damit erklärbar sein, dass die beiden Tests in frühen Stadien einer Infektion Antikörper zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachweisen. Eine Studie an experimentell

infizierten Tieren nutzte sowohl einen IFA als auch den SNAP[®]4Dx[®] zum Nachweis von *Anaplasma*-Antikörpern. Hier wurden mit dem IFA Antikörper früher nachgewiesen (10 bis 14 Tage nach Infektion) als mit dem SNAP[®]4Dx[®] (17 bis 30 Tage nach Infektion) (SCORPIO et al., 2011). Allerdings gibt der Hersteller des SNAP[®]4Dx[®] an, dass der Test Antikörper bereits acht Tage nach Infektion nachweisen kann (CHANDRASHEKAR et al., 2008). Vermutlich bestehen Unterschiede zwischen den beiden Tests auch darin, wie lange sie Antikörper nachweisen können. Dies ist aber zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Diese schlechte Übereinstimmung zwischen den beiden Antikörpernachweismethoden untermauert eher die Vermutung, dass eine erhebliche Anzahl falsch positiver Tests in beiden Testsystemen vorkommt.

Die Daten der ersten Studie der vorliegenden Arbeit („Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum*, and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany“) zeigten, dass nur 2,0 % der untersuchten Hundepopulation Antikörper gegen beide Erreger hatten. Da beide Erreger durch denselben Vektor übertragen und Koinfektionen als häufig angenommen werden (NIETO & FOLEY, 2008; CARRADE et al., 2009), wäre eine höhere Prävalenz zu erwarten gewesen. Im Hinblick auf Doppelinfektionen waren jedoch Berner Sennenhunde auffällig. Denn Berner Sennenhunde hatten zum einen signifikant häufiger Antikörper gegen *B. burgdorferi* sl ($p = 0,040$) und auch signifikant häufiger Antikörper gegen beide Erreger gleichzeitig ($p < 0,001$). Die Annahme, dass nur eine den Berner Sennenhunden eigene große Körperoberfläche und das langes Haarkleid zu vermehrtem Vektorkontakt und damit zu vermehrtem und längerem Erregerkontakt führt, ist nicht richtig. Eine Schweizer Studie zeigte, dass andere großrahmige und langhaarige Kontrollhunde mit ähnlicher Aktivität im Freien nicht ein häufigeres Auftreten von Antikörpern zeigten (GERBER et al., 2007). So wurde in der genannten Studie festgestellt, dass Berner Sennenhunde signifikant häufiger Antikörper gegen *B. burgdorferi* sl hatten als langhaarige, große Hunde der Kontrollgruppe. Folglich kann hier von einer echten Rasseprädisposition ausgegangen werden. Die vorliegende Studie ergab, dass Berner Sennenhunde nur ein erhöhtes Risiko haben, Antikörper gegen *B. burgdorferi* sl und gegen beide Erreger zu haben, nicht aber gegen *A. phagozytophilum* allein. Intensive Zuchtbestrebungen wie bei Berner Sennenhunden könnten mit einer verminderten Abwehr gegen spezifische

Pathogene verbunden sein. Die unterschiedlichen Eigenschaften in der Pathogenität beider Erreger, *B. burgdorferi* sl als extrazellulärer und *A. phagozytophilum* als intrazellulärer Erreger führt zu unterschiedlichen Reaktionen des Immunsystems auf eine Infektion. Dies könnte die unterschiedlichen Reaktionen des Immunsystems auf Infektionen mit diesen beiden Erregern bei Berner Sennenhunden erklären.

Die Studienpopulation der ersten Studie wurde auch auf Signalement und anamnestiche Daten hin näher untersucht. Die Altersverteilung innerhalb dieser Studienpopulation ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Hunden mit Antikörpern gegen *B. burgdorferi* sl und/oder *A. phagozytophilum* (Median 6 Jahre) und oder Hunden, die negativ getestet wurden (Median 7 Jahre). Das ist insofern erstaunlich, da man annehmen sollte, dass mit zunehmendem Alter der Kontakt zu Zecken als Vektoren kumuliert und somit auch ein höheres Risiko der Erregerexposition besteht. Männliche Hunde hatten signifikant häufiger Antikörper gegen *A. phagozytophilum* als weibliche Hunde. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Allerdings sind im Falle der humanen granulozytären Anaplasiose Männer ebenfalls geringfügig häufiger betroffen als Frauen.

Hunde mit Antikörpern gegen *B. burgdorferi* sl, *A. phagozytophilum* oder gegen beide Erreger gleichzeitig hatten signifikant häufiger einen dokumentierten Befall mit Zecken als Hunde mit negativen Testergebnissen. Dieses Ergebnis war zu erwarten. Keine Unterschiede bestanden jedoch im Hinblick auf Zeckenprophylaxe, Reisevorbericht oder Lebensraum (ländlich *versus* Stadtgebiet). Damit wurde die Annahme einer anderen Studie, dass Hunde, die in ländlichem Umfeld leben, häufigeren Kontakt mit Zecken als Überträger von Pathogenen haben (GERBER et al., 2007), nicht bestätigt. In der vorliegenden Studie kann das möglicherweise durch die großen Grünanlagen und Parks auch in der Innenstadt Münchens erklärt werden.

Bei Hunden, die keine Antikörper gegen *A. phagozytophilum* hatten, wurde signifikant häufiger die Diagnose „gesund“ gestellt als bei solchen, die *A.-phagozytophilum*-Antikörper-positiv waren. Zudem wurden Hunde ohne Antikörper gegen Anaplasmen signifikant häufiger in der Gesundheitsvorsorge vorgestellt. Das heißt also, dass Hunde mit *A.-phagozytophilum*-Antikörpern häufiger krank waren als *A.-phagozytophilum*-Antikörper-negative Hunde. Eine Infektion mit *A. phagozytophilum* kann zu Neutropenie und beeinträchtigter

Funktion von neutrophilen Granulozyten führen. Somit kann eine Anaplasmen-Infektion für opportunistische Infektionen prädisponieren (CARLYON et al., 2002; BAKKEN & DUMLER, 2008). Bei Wiederkäuern ist bekannt, dass eine Infektion mit *A. phagozytophilum* die Zahl an zirkulierenden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen im peripheren Blut reduziert sowie die Antikörperantwort und Emigration von neutrophilen Granulozyten beeinträchtigt. Weiterhin wird die Phagozytoseaktivität und Fähigkeit zur intrazellulären Zerstörung von Erregern gestört (BRODIE et al., 1986; LEPIDI et al., 2000; DUMLER, 2005). Bei Hunden konnte gezeigt werden, dass die auf eine *A.-phagozytophilum*-Infektion folgende Entzündungsreaktion zu Gewebeschäden in zahlreichen Organsystemen führen kann (DUMLER, 2005). Somit scheint eine Infektion mit *A. phagozytophilum* zu Störungen in der Entzündungs- und Immunreaktion eines Wirtes zu führen und hat damit das Potential, die Reaktionsmöglichkeiten des Wirtes auf andere Krankheitsprozesse zu beeinflussen.

Hunde mit Antikörpern gegen *A. phagozytophilum* zeigten auch häufiger ein schlechtes Allgemeinbefinden als Hunde ohne Antikörper gegen diesen Erreger (41/78, $p = 0,002$). Dies ist ebenfalls ein Zeichen dafür, dass eine *Anaplasma*-Infektion die Gesundheit eines Hundes beeinflusst. Ebenso hatten Hunde mit Antikörpern gegen *A. phagozytophilum* häufiger eine erhöhte Körpertemperatur als negativ getestete Hunde (9/78, $p = 0,002$). Dennoch konnte bei sieben von neun dieser Hunde mit Fieber eine andere Diagnose gestellt werden, die das Fieber erklären könnte (ein Hund mit ulzerativer Kolitis, zwei mit steroid-responsiver Meningitis-Arteriitis, einer mit Pneumonie, einer mit monozytärer Leukämie sowie ein Hund mit Babesiose). Bei keinem der Hunde mit Fieber konnten im Blutaussstrich Morulae nachgewiesen werden. In einer Studie bei experimentell infizierten Hunden wurden jedoch bei allen Hunden in der febrilen Phase der Infektion Morulae identifiziert (EGENVALL et al., 1998). In einer weiteren Studie aus Deutschland wurden bei zehn von 18 Hunden mit natürlicher *A.-phagozytophilum*-Infektion intragranulozytäre Einschlusskörper nachgewiesen (KOHN et al., 2008). Somit kann angenommen werden, dass Morulae nachweisbar gewesen wären, wenn das Fieber bei den Hunden in der vorliegenden Studie tatsächlich aufgrund der *Anaplasma*-Infektion aufgetreten wäre.

Auch im Differenzialblutbild und im Serumorganprofil bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vorliegens einer Thrombozytopenie,

Leukopenie oder anderen hämatologischen Veränderungen oder anderen labordiagnostischen Veränderungen zwischen Hunden mit Antikörpern gegen *A. phagozytophilum* und/oder *B. burgdorferi* sl und negativ getesteten Hunden. Zu erwarten wäre bei *Anaplasma*-infizierten Hunden insbesondere eine Thrombozytopenie gewesen. Nur sieben von 78 Hunden mit Antikörpern gegen *A. phagozytophilum* hatten eine Thrombozytopenie. Bei vier dieser sieben Hunde waren vermutlich andere Erkrankungen für diese labordiagnostische Veränderung verantwortlich (ein Hund mit Babesiose, zwei Hunde mit Neoplasie (monozytäre Leukämie, malignes Lymphom), ein Hund mit Pneumonie). Bei den anderen drei Hunden bestand der Verdacht auf eine primär immun-medierte Thrombozytopenie (ITP). Dennoch kann bei diesen Tieren eine *A. phagozytophilum*-Infektion als mögliche Ursache für die Thrombozytopenie nicht ausgeschlossen werden. In einer schwedischen Studie mit experimentell infizierten Hunden zeigten alle Hunde deutliche hämatologische Veränderungen mit ausgeprägter Thrombozytopenie und mittelgradiger Leukopenie (EGENVALL et al., 1998). Auch in anderen Studien war eine Thrombozytopenie eine sehr häufig beobachtete labordiagnostische Veränderung (GREIG et al., 1996; POITOUT et al., 2005; KOHN et al., 2008). Oft liegen antithrombozytäre Antikörper vor, also eine sekundäre ITP. Bei den Hunden in der vorliegenden Studie bestand jedoch kein signifikanter Unterschied im Vorliegen labordiagnostischer Veränderungen zwischen Hunden mit Antikörpern gegen *A. phagozytophilum* und antikörper-negativen Kontrollhunden.

Auch die vier Hunde in der dritten Studie („Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs“), die ein positives *A. phagozytophilum*-PCR-Ergebnis hatten, wurden im Hinblick auf klinische Symptomatik sowie hämatologische und serumchemische Parameter näher betrachtet. Alle vier Hunde waren erkrankt. Allerdings wurden bei drei der Hunde ebenfalls andere Erkrankungen diagnostiziert, die die bestehenden Symptome hinreichend erklärten. Einer dieser Hunde mit positiver *Anaplasma*-PCR zeigte ausgeprägte respiratorische Symptome aufgrund einer schweren Pneumonie. Diese hochgradige Entzündung führte zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie und war damit auch vermutlich für die milde Thrombozytopenie verantwortlich, die dieser Patient zeigte. Obwohl milde respiratorische Symptome in Einzelfällen im Zusammenhang mit einer Anaplasmosenose beim Hund und selten

auch beim Menschen beschrieben sind (POITOUT et al., 2005; BAKKEN & DUMLER, 2008), sind andere Ursachen für die respiratorischen Symptome bei diesem Hund viel wahrscheinlicher. Beim zweiten PCR-positiven Hund wurde eine akute Gastroenteritis diagnostiziert. Der dritte Hund hatte einen gastralen Fremdkörper. Keine der Symptome dieser beiden Hunde standen im Zusammenhang mit einer Anaplasiose. Der vierte Hund hatte (zusätzlich zur positiven *Anaplasma*-PCR) nicht nur Antikörper gegen *A. phagozytophilum*, sondern auch Antikörper gegen *E. canis*. Dieser Patient wurde mit hohem Fieber, hochgradig reduziertem Allgemeinbefinden und blassen Schleimhäuten vorgestellt. Labordiagnostisch zeigte dieser Hund eine hochgradige Thrombozytopenie, eine milde Anämie und antithrombozytäre Antikörper. Alle klinischen und labordiagnostischen Veränderungen dieses Patienten könnten mit einer Ehrlichiose erklärt werden. Dieser Hund hatte sich kürzlich im Süden Spaniens aufgehalten, was eine Infektion mit *E. canis* durchaus möglich macht. Allerdings war eine *E.-canis*-PCR, die bei diesem Patienten durchgeführt wurde, negativ. Die *A.-phagozytophilum*-PCR hingegen gilt als sehr spezifisch und detektiert nicht *E. canis*. Darüber hinaus war der Antikörpertiter für *A. phagozytophilum* (IFA) sehr hoch (1:5120). Daher ist es durchaus denkbar, dass das Ergebnis des Antikörpertests für *E. canis* (Nachweis mittels SNAP®4Dx®) ein falsch positives Ergebnis war (z. B. als Kreuzreaktion mit *A. phagozytophilum*). Somit könnte dieser Patient tatsächlich nur mit *A. phagozytophilum* infiziert gewesen sein. Jedoch ist dies nicht sehr wahrscheinlich, da die Spezifität des SNAP®4Dx® für die *E.-canis*-Detektion mit 100 % angegeben wird (BREITSCHWERDT et al., 1998; POITOUT et al., 2005). Folglich könnte dieser Patient doch mit beiden Pathogenen infiziert gewesen sein. Welches dieser Pathogene die klinische Symptomatik und labordiagnostischen Veränderungen hervorgerufen hat, kann nicht sicher geklärt werden. Beide Infektionen können sich diesbezüglich sehr ähneln.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der ersten Studie war es, zum einen die Antikörperprävalenz gegen *B. burgdorferi* sI und *Anaplasma phagozytophilum* bei Hunden im Raum München zu erheben. Zudem wurden die klinischen Symptome und die labordiagnostischen Veränderungen von antikörperpositiven Hunden dokumentiert und mit denen einer negativen Kontrollgruppe verglichen. Dafür wurden 448 randomisiert eingeschlossene Hunde untersucht. Mittels des SNAP[®]4Dx[®] (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) wurden diese Hunde auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* sI und *A. phagozytophilum* getestet. 100 Hunde mit Antikörpern gegen diese Erreger wurden als „positiv“ klassifiziert; die jeweils darauffolgenden 100 Hunde mit negativem Testergebnis wurden als Kontrollgruppe zusammengefasst. Sowohl klinische als auch labordiagnostische Parameter der Hunde aus beiden Gruppen wurden miteinander verglichen. 4,9 % (22 Hunde) hatten Antikörper gegen *B. burgdorferi* sI; 19,4 % (78 Hunde) hatten Antikörper gegen *A. phagozytophilum*. 2,0 % der Studienpopulation (9 Hunde) hatten gleichzeitig Antikörper gegen beide Erreger. Berner Sennenhunde hatten signifikant häufiger Antikörper gegen *B. burgdorferi* sI und gegen beide Erreger gleichzeitig. Bei Tieren mit negativem Testergebnis wurde signifikant häufiger die Diagnose „gesund“ gestellt als bei Tieren mit Antikörpern gegen *A. phagozytophilum*. *A.-phagozytophilum*-positive Tiere zeigten zudem signifikant häufiger Fieber und ein schlechtes Allgemeinbefinden als Hunde der negativen Kontrollgruppe. Darüber hinaus bestanden hinsichtlich klinischer oder labordiagnostischer Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen Hunde mit Antikörpern gegen die Erreger und negativ getesteten Tieren. Obwohl negativ getestete Hunde grundsätzlich häufiger gesund waren als Tiere mit positivem Ergebnis im SNAP[®]4Dx[®], konnten zwischen positiven und negativen Hunden keine signifikanten Unterschiede in Parametern identifiziert werden, die als spezifisch für eine Infektion mit *B. burgdorferi* sI und *A. phagozytophilum* angesehen werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ein Test, der Antikörper nachweist, nicht in der Lage ist, die klinische Erkrankung zu diagnostizieren.

Ziel der zweiten Studie war es, verschiedene, in der tiermedizinischen Praxis häufig verwendete Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* zu

vergleichen, darunter IFA IgG und IgM, KELA, SNAP[®]4Dx[®] und Western blot. Weiterhin wurden Sensitivität und Spezifität der Tests in Bezug auf den Western blot als Gold Standard festgestellt. Hierfür wurden 200 Hundeseren auf das Vorliegen von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* mit den oben genannten Methoden getestet. Die Sensitivität des IFA IgG war 76,6 %, die Spezifität 87,1 %. Die Sensitivität des IFA IgM war 26,3 %, die Spezifität 81,0 %. Die Sensitivität des KELA war 100 %, die Spezifität 75,4 %. Die Sensitivität des SNAP[®]4Dx[®] war 84,2 %, die Spezifität 98,2 %. Der SNAP[®]4Dx[®] zeigte eine nahezu perfekte Übereinstimmung mit dem Western blot als Gold Standard. Weder IFA IgG noch IFA IgM können aufgrund ihrer geringen Sensitivität und Spezifität zur Diagnose einer *Borrelia*-Infektion empfohlen werden. Der KELA kann mit seiner exzellenten Sensitivität zwar als guter Screening-Test dienen, jedoch müssen positive Ergebnisse mit einem zweiten Test, wie beispielsweise mittels Western blot, verifiziert werden. Der SNAP[®]4Dx[®] zeigte sehr gute Sensitivität und Spezifität und kann, auch aufgrund seiner einfachen Handhabung und Interpretierbarkeit, sehr gut als Test in der Praxis verwendet werden und damit, zumindest bei nicht vorbehandelten Patienten, den deutlich aufwändigeren Western blot ersetzen.

Ziel der dritten Studie war es, verschiedene Tests in der Diagnostik von *A. phagozytophilum* zu vergleichen (IFA, SNAP[®]4Dx[®] und PCR) und die Sensitivität und Spezifität von IFA und SNAP[®]4Dx[®] zu ermitteln. Als Gold Standard wurde die PCR als direkte Erreger-Nachweismethode gewählt. Die Untersuchungen wurden an 200 Blutproben durchgeführt. Die Sensitivität sowohl des IFA als auch des SNAP[®]4Dx[®] war 100 %. Die Spezifität des IFA war 52,9 %, die des SNAP[®]4Dx[®] 57,4 %. Beide Antikörpernachweismethoden stimmten in ihren Ergebnissen nur mäßig überein (Kappa 0,334). Aufgrund ihrer exzellenten Sensitivität können beide Tests als Screening-Tests und zum Ausschluss einer Infektion mit *A. phagozytophilum* verwendet werden. Die Spezifität dieser beiden Methoden war jedoch gering, und die Tests zeigten keine gute Übereinstimmung. Es bleibt offen, ob die geringe Spezifität tatsächlich aus falsch positiven Resultaten der Antikörpertests resultiert oder aber die PCR bei vielen eigentlich infizierten Hunden falsch negativ reagiert.

VIII. SUMMARY

Aim of the first study „Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany” was to determine the prevalence of antibodies against these two agents in the dog population of the area of Munich. Further, the clinical presentation and laboratory values of antibody-positive dogs were compared to those of a negative control group. For this purpose, 448 randomly selected dogs were screened for the presence of antibodies to *Borrelia* (*B.*) *burgdorferi* sensu lato (sl) and *Anaplasma* (*A.*) *phagocytophilum* with the SNAP[®]4Dx[®] assay (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA). Dogs with antibodies against *B. burgdorferi* sl and/or *A. phagocytophilum* were determined as “positive” (n = 100). The following 100 dogs with negative result in the SNAP[®]4Dx[®] served as control group. Physical examination and laboratory parameters were assessed in all dogs of both groups, and all parameters were compared between dogs of the positive and dogs of the negative group. Twenty two dogs (4.9 %) had antibodies to *B. burgdorferi* sl. Seventy eight dogs (19.4 %) had antibodies against *A. phagocytophilum*. Nine dogs (2.0 %) had antibodies to both agents simultaneously. Bernese mountain dogs had significantly more often antibodies to *B. burgdorferi* sl and to both agents. Negative dogs were more often diagnosed as “healthy” than dogs with antibodies to *A. phagocytophilum*. The dogs with antibodies to *A. phagocytophilum* dogs also had more often an elevated body temperature and a poor general condition. Except that, there were no significant differences in clinical or laboratory changes between dogs with negative or dogs with positive result in the SNAP[®]4Dx[®]. Although dogs with negative result in the SNAP[®]4Dx[®] were more often considered healthy, there were no differences in parameters considered “specific” for both infections between dogs with or without antibodies to those agents. Hence, test systems detecting antibodies against *B. burgdorferi* sl and *A. phagocytophilum* are not able to diagnose the clinical disease.

Aim of the second study “Comparison of different diagnostic tools for the detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in dogs” was to compare different commonly used diagnostic tools, like immunofluorescence test (IFA), kinetic enzyme-linked immunosorbent assay (KELA), SNAP[®]4Dx[®] assays, and

Western blot (WB), and to determine sensitivity and specificity, and predictive values, including their 95% confidence intervals, when compared to the WB as gold standard. For that purpose, 200 canine sera were tested for the presence of *Borrelia*-specific antibodies with IFA, KELA, SNAP[®]4Dx[®], and WB. Sensitivity and specificity of IFA IgG was 76.6% and 87.1%, respectively. Sensitivity and specificity of IFA IgM was 26.3% and 81.0%, respectively. Sensitivity and specificity of KELA was 100% and 75.4%, respectively. Sensitivity and specificity of SNAP[®]4Dx[®] was 84.2% and 98.5%, respectively. SNAP[®]4Dx[®] showed almost perfect agreement with WB (kappa 0.847). In conclusion, IFA IgG and IFA IgM had very low sensitivity and specificity and cannot be recommended to diagnose *Borrelia* spp. infections. KELA showed excellent sensitivity and can be recommended as screening test, but positive results require confirmation. SNAP[®]4Dx[®] had very good sensitivity and specificity and can replace the more labor-intensive WB, at least in untreated patients.

Aim of the third study “Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs” was to compare two antibody tests, IFA and the in-house ELISA SNAP[®]4Dx[®], and to determine the correlation of these methods with PCR results by evaluating sensitivity and specificity of the antibody tests when compared to PCR used here as gold standard. For that purpose, sera of 200 prospectively included dogs were tested for the presence of antibodies to *A. phagocytophilum* using IFA and SNAP[®]4Dx[®]. Direct detection of the organism in whole blood was performed by PCR. Sensitivity, specificity, and predictive values, including their 95% confidence intervals, were calculated for IFA and SNAP[®]4Dx[®] when compared to the gold standard PCR. Sensitivity of both IFA and SNAP[®]4Dx[®] was 100%. Specificity of IFA was 52.9%, specificity of SNAP[®]4Dx[®] was 57.4%. Agreement of both antibody tests was only fair (kappa 0.334). Based on these data, it can be concluded that IFA and SNAP[®]4Dx[®] can be useful as screening methods due to their excellent sensitivity. Their specificity, however, was low and agreement between both antibody tests was insufficient. The question, whether antibody test results are truly false positive or whether PCR is false negative in many dogs that are actually infected, still remains open.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 484–509.

Alban PS, Johnson PW, Nelson DR. Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. Microbiology 2000; 146: 119–27.

Appel MJ. Lyme disease in dogs and cats. Compend Contin Educ Pract Vet 1990; 12: 617–26.

Appel MJ, Allan S, Jacobson RH, Lauderdale TL, Chang YF, Shin SJ, Thomford JW, Todhunter RJ, Summers BA. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. J Infect Dis 1993; 167: 651–64.

Arnez M, Ruzic-Sabljić E, Ahčan J, Radsel-Medvescek A, Pleterški-Rigler D, Strle F. Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of children with solitary erythema migrans. Pediatr Infect Dis J 2001; 20: 251–5.

Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schrieffer ME, Gilmore RD, Jr., Philipp MT, Steere AC, Wormser GP, Marques AR, Johnson BJ. Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. J Infect Dis 2003; 187: 1187–99.

Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, Tilden RL, Asanovich K, Dumler JS. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. Jama 1996; 275: 199–205.

Bakken JS, Dumler S. Human granulocytic anaplasmosis. Infect Dis Clin North Am 2008; 22: 433–48.

Baranton G, Seinost G, Theodore G, Postic D, Dykhuizen D. Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity. *Res Microbiol* 2001; 152: 149–56.

Barlough JE, Jacobson RH, Downing DR, Lynch TJ, Scott FW. The kinetics-based enzyme-linked immunosorbent assay for coronavirus antibodies in cats: calibration to the indirect immunofluorescence assay and computerized standardization of results through normalization to control values. *Can J Vet Res* 1987; 51: 56–9.

Barutzki D, De Nicola A, Zeziola M, Reule M. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006; 119: 342–7.

Baumgarten BU, Rollinghoff M, Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic *ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3448–51.

Beall MJ, Chandrashekar R, Eberts MD, Cyr KE, Diniz PP, Mainville C, Hegarty BC, Crawford JM, Breitschwerdt EB. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 455–64.

Belfaiza J, Postic D, Bellenger E, Baranton G, Girons IS. Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2873–7.

Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 763–72.

Boerlin P, Peter O, Bretz AG, Postic D, Baranton G, Piffaretti JC. Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Infect Immun* 1992; 60: 1677–83.

Branda JA, Aguero-Rosenfeld ME, Ferraro MJ, Johnson BJ, Wormser GP, Steere AC. 2-tiered antibody testing for early and late Lyme disease using only an immunoglobulin G blot with the addition of a VlsE band as the second-tier test. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 20–6.

Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2645–51.

Brodie TA, Holmes PH, Urquhart GM. Some aspects of tick-borne diseases of British sheep. *Vet Rec* 1986; 118: 415–8.

Brorson O, Brorson SH. Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection* 1997; 25: 240–6.

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 1982; 216: 1317–9.

Callister SM, Jobe DA, Schell RF, Lovrich SD, Onheiber KL, Korshus JB. Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with *Borrelia burgdorferi*-infected ixodes scapularis ticks. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3670–4.

Carlyon JA, Chan WT, Galan J, Roos D, Fikrig E. Repression of *rac2* mRNA expression by *Anaplasma phagocytophila* is essential to the inhibition of superoxide production and bacterial proliferation. *J Immunol* 2002; 169: 7009–18.

Carlyon JA, Fikrig E. Mechanisms of evasion of neutrophil killing by *Anaplasma phagocytophilum*. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 28–33.

Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1129–41.

Chandrashekar R, Mainville C, Daniluk D. Performance of an in-clinic test,

SNAP 4Dx, for the detection of antibodies to canine granulocytic infection, *Anaplasma phagocytophilum* [abstract]. J Vet Intern Med 2008; 820.

Chandrashekar R, Mainville CA, Beall MJ, O'Connor T, Eberts MD, Alleman AR, Gaunt SD, Breitschwerdt EB. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. Am J Vet Res 2010; 71: 1443–50.

Chang YF, Novosel V, Chang CF, Summers BA, Ma DP, Chiang YW, Acree WM, Chu HJ, Shin S, Lein DH. Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*-infected ticks and treated with dexamethasone. Am J Vet Res 2001; 62: 1104–12.

Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. Annu Rev Genet 2002; 36: 47–73.

Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol 1994; 32: 589–95.

Choi KS, Dumler JS. Early induction and late abrogation of respiratory burst in *A. phagocytophilum*-infected neutrophils. Ann N Y Acad Sci 2003; 990: 488–93.

Cinco M, Padovan D, Murgia R, Maroli M, Frusteri L, Heldtander M, Johansson KE, Engvall EO. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol 1997; 35: 3365–6.

Cotte V, Bonnet S, Cote M, Vayssier-Taussat M. Prevalence of Five Pathogenic Agents in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from Western France. Vector Borne Zoonotic Dis 2009; 10

Craft JE, Grodzicki RL, Shrestha M, Fischer DK, Garcia-Blanco M, Steere AC. The antibody response in Lyme disease. *Yale J Biol Med* 1984; 57: 561–5.

Crippa M, Rais O, Gern L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002; 2: 3–9.

Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ. Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). *Vet Pathol* 1997; 34: 85–96.

Des Vignes F, Piesman J, Heffernan R, Schulze TL, Stafford KC, 3rd, Fish D. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 2001; 183: 773–8.

Diniz PP, Beall MJ, Omark K, Chandrashekar R, Daniluk DA, Cyr KE, Koterski JF, Robbins RG, Lalo PG, Hegarty BC, Breitschwerdt EB. High prevalence of tick-borne pathogens in dogs from an Indian reservation in northeastern Arizona. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10: 117–23.

Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993; 167: 392–400.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 2145–65.

Dumler JS. *Anaplasma* and *Ehrlichia* infection. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1063: 361–73.

Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1828–34.

Dumler JS, Barat NC, Barat CE, Bakken JS. Human granulocytic anaplasmosis and macrophage activation. Clin Infect Dis 2007a; 45: 199–204.

Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis 2007b; 45 Suppl 1: S45–51.

Dyachenko V, Pantchev N, Balzer HJ, Meyersen A, Straubinger RK. First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. Parasit Vectors 2012; 5: 49.

Eberts MD, Vissotto de Paiva Diniz PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. J Am Anim Hosp Assoc 2011; 47: 86–94.

Egenvall A, Bjoersdorff A, Lilliehook I, Olsson Engvall E, Karlstam E, Artursson K, Hedhammar A, Gunnarsson A. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. Vet Rec 1998; 143: 412–7.

Egenvall A, Lilliehook I, Bjoersdorff A, Engvall EO, Karlstam E, Artursson K, Heldtander M, Gunnarsson A. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. Vet Rec 2000; 146: 186–90.

Egenvall AE, Hedhammar AA, Bjoersdorff AI. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. Vet Rec 1997; 140: 222–6.

Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol 1995; 33: 419–27.

Falco RC, McKenna DF, Daniels TJ, Nadelman RB, Nowakowski J, Fish D, Wormser GP. Temporal relation between *Ixodes scapularis* abundance and risk for Lyme disease associated with erythema migrans. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 771–6.

Feder BM, Joseph RJ, Moroff SD, Schneider EM, Bosler EM. *Borrelia burgdorferi* antibodies in canine cerebrospinal fluid. *J Vet Intern Med* 1991; 5: 137.

Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B. Coexistence of *ehrlichiae* of the *phagocytophila* group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol* 1999; 188: 145–9.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997; 390: 580–6.

Fritz CL, Kjemtrup AM. Lyme borreliosis. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 1261–70.

Fukunaga M, Yabuki M, Hamase A, Oliver JH, Jr., Nakao M. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. *J Parasitol* 2000; 86: 38–43.

Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reusch CE. Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. *BMC Vet Res* 2007; 3: 15.

Gerber B, Haug K, Eichenberger S, Reusch CE, Wittenbrink MM. Comparison of

a rapid immunoassay for antibodies to the C6 antigen with conventional tests for antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in Europe. Vet Rec 2009; 165: 594–7.

Gern L, Lebet N, Moret J. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. Exp Appl Acarol 1996; 20: 649–58.

Gillespie JJ, Wattam AR, Cammer SA, Gabbard J, Shukla MP, Dalay O, Driscoll T, Hix D, Mane SP, Mao C, Nordberg EK, Scott M, Schulman JR, Snyder EE, Sullivan DE, Wang C, Warren A, Williams KP, Xue T, Yoo HS, Zhang C, Zhang Y, Will R, Kenyon RW, Sobral BW. PATRIC: The Comprehensive Bacterial Bioinformatics Resource with a Focus on Human Pathogenic Species. Infect Immun 2011; 79: 4286–98.

Girschick HJ, Huppertz HI, Russmann H, Krenn V, Karch H. Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. Rheumatol Int 1996; 16: 125–32.

Gomes-Solecki MJ, Meirelles L, Glass J, Dattwyler RJ. Epitope length, genospecies dependency, and serum panel effect in the IR6 enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi*. Clin Vaccine Immunol 2007; 14: 875–9.

Granick JL, Armstrong PJ, Bender JB. *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). J Am Vet Med Assoc 2009; 234: 1559–65.

Gray JS, Kahl O, Robertson JN, Daniel M, Estrada-Pena A, Gettinby G, Jaenson TG, Jensen P, Jongejan F, Korenberg E, Kurtenbach K, Zeman P. Lyme borreliosis habitat assessment. Zentralbl Bakteriol 1998; 287: 211–28.

Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. J Clin Microbiol 1996; 34: 44–8.

Gruntar I, Malovrh T, Murgia R, Cinco M. Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo. *Apmis* 2001; 109: 383–8.

Guerra MA, Walker ED, Kitron U. Canine surveillance system for Lyme borreliosis in Wisconsin and northern Illinois: geographic distribution and risk factor analysis. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 546–52.

Halperin J, Luft BJ, Volkman DJ, Dattwyler RJ. Lyme neuroborreliosis. Peripheral nervous system manifestations. *Brain* 1990; 113: 1207–21.

Halperin JJ, Volkman DJ, Wu P. Central nervous system abnormalities in Lyme neuroborreliosis. *Neurology* 1991; 41: 1571–82.

Hamel D, Rohrig E, Pfister K. Canine vector-borne disease in travelled dogs in Germany--a retrospective evaluation of laboratory data from the years 2004–2008. *Vet Parasitol* 2011; 181: 31–6.

Herron MJ, Ericson ME, Kurtti TJ, Munderloh UG. The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1063: 374–82.

Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 364–7.

Hodzic E, Fish D, Maretzki CM, De Silva AM, Feng S, Barthold SW. Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3574–8.

Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Aguero-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK, Wong SJ, Chu F, Liveris D, Schwartz I. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1998; 339: 375–8.

Hovius KE, Stark LA, Bleumink-Pluym NM, van de Pol I, Verbeek-de Kruif N, Rijpkema SG, Schouls LM, Houwers DJ. Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction. Vet Q 1999; 21: 54–8.

Hulinska D, Votypka J, Kriz B, Holinkova N, Novakova J, Hulinsky V. Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia* spp. isolated from *Ixodes ricinus* ticks by using electrophoretic chips and real-time polymerase chain reaction. Folia Microbiol (Praha) 2007; 52: 315–24.

Huppertz HI, Bohme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA. Incidence of Lyme borreliosis in the Wurzburg region of Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 697–703.

Ijdo JW, Meek JI, Cartter ML, Magnarelli LA, Wu C, Tenuta SW, Fikrig E, Ryder RW. The emergence of another tickborne infection in the 12-town area around Lyme, Connecticut: human granulocytic ehrlichiosis. J Infect Dis 2000; 181: 1388–93.

Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. Clin Lab Med 2010; 30: 261–92.

Jaderlund KH, Egenvall A, Bergstrom K, Hedhammar A. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. Vet Rec 2007; 160: 825–31.

Jaderlund KH, Bergstrom K, Egenvall A, Hedhammar A. Cerebrospinal fluid PCR and antibody concentrations against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs with neurological signs. J Vet Intern Med 2009; 23: 669–72.

Jaenson TG. The epidemiology of lyme borreliosis. Parasitol Today 1991; 7: 39–45.

Jaulhac B, Heller R, Limbach FX, Hansmann Y, Lipsker D, Monteil H, Sibilia J, Piemont Y. Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with lyme arthritis. J Clin Microbiol 2000; 38: 1895–900.

Jensen J, Simon D, Murua Escobar H, Soller JT, Bullerdiek J, Beelitz P, Pfister K, Nolte I. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Zoonoses Public Health 2007; 54: 94–101.

Kahl O, Janetzki-Mittmann C, Gray JS, Jonas R, Stein J, de Boer R. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. Zentralbl Bakteriologie 1998; 287: 41–52.

Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis 2001; 33: 780–5.

Katavolos P, Armstrong PM, Dawson JE, Telford SR, 3rd. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. J Infect Dis 1998; 177: 1422–5.

Kersten A, Poitschek C, Rauch S, Aberer E. Effects of penicillin, ceftriaxone, and doxycycline on morphology of *Borrelia burgdorferi*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1127–33.

Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. J Vet Intern Med 2008; 22: 1289–95.

Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Res Vet Sci 2011; 91: 71–6.

Korshus JB, Munderloh UG, Bey RF, Kurtti TJ. Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto using *Ixodes scapularis* ticks artificially infected by capillary feeding. Med Microbiol Immunol 2004; 193: 27–34.

Krupka I, Pantchev N, Lorentzen L, Weise M, Straubinger R. Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland. Prakt Tierarzt 2007; 88: 776–88.

Krupka I, Knauer J, Lorentzen L, O'Connor TP, Saucier J, Straubinger RK. *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe induce diverse immune responses against C6 peptides in infected mice. Clin Vaccine Immunol 2009; 16: 1546–62.

Krupka I, Straubinger RK. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2010; 40: 1103–19.

Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schafer SM, Sewell HS, Brade V, Kraiczky P. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement. Trends Microbiol 2002; 10: 74–9.

Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 921–5.

Lepidi H, Bunnell JE, Martin ME, Madigan JE, Stuen S, Dumler JS. Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. Am J Trop Med Hyg 2000; 62: 29–37.

Leuba-Garcia S, Kramer MD, Wallich R, Gern L. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. Zentralbl Bakteriol 1994; 280: 468–75.

Levy S, O'Connor TP, Hanscom JL, Shields P. Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status of dogs naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. Vet Ther 2002; 3: 308–15.

Levy SA, Duray PH. Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. Similarity to human Lyme carditis. J Vet Intern Med 1988; 2: 138–44.

Levy SA, Magnarelli LA. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. J Am Vet Med Assoc 1992; 200: 344–7.

Levy SA. Use of a C6 ELISA test to evaluate the efficacy of a whole-cell bacterin for the prevention of naturally transmitted canine *Borrelia burgdorferi* infection. Vet Ther 2002; 3: 420–4.

Liang FT, Philipp MT. Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 1999; 67: 6702–6.

Liang FT, Aberer E, Cinco M, Gern L, Hu CM, Lobet YN, Ruscio M, Voet PE, Jr., Weynants VE, Philipp MT. Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* SL. J Infect Dis 2000a; 182: 1455–62.

Liang FT, Jacobson RH, Straubinger RK, Grooters A, Philipp MT. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 2000b; 38: 4160–6.

Littman MP. Canine borreliosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003; 33: 827–62.

Littman MP, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE. ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 422–34.

Madewell BR, Gribble DH. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 512–4.

Madigan JE, Gribble D. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). *J Am Vet Med Assoc* 1987; 190: 445–8.

Magnarelli LA, Anderson JF, Schreier AB. Persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs of New York and Connecticut. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 196: 1064–8.

Mandel NS, Senker EG, Bosler EM, Schneider EM. Intrathecal production of *Borrelia burgdorferi* specific antibodies in a dog with central nervous system Lyme borreliosis. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1993; 15: 581–6.

Maraspin V, Ruzic-Sabljic E, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Jurca T, Picken RN, Strle F. Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of patients with erythema migrans. *Infection* 2001; 29: 65–70.

Maretzki CH, Fisher DJ, Greene CE. Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1994; 205: 1554–6.

Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 1545–63.

Marques A. Chronic Lyme disease: a review. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22: 341–60.

Marques AR. Lyme disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010; 10: 13–20.

Matuschka FR, Eiffert H, Ohlenbusch A, Spielman A. Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in central Europe. *J Infect Dis* 1994; 170: 122–7.

Matuschka FR, Allgower R, Spielman A, Richter D. Characteristics of garden dormice that contribute to their capacity as reservoirs for lyme disease spirochetes. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 707–11.

Menn B, Lorentz S, Naucke TJ. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors* 2010; 3: 34.

Milutinovic M, Masuzawa T, Tomanovic S, Radulovic Z, Fukui T, Okamoto Y. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp Appl Acarol* 2008; 45: 171–83.

Montgomery RR, Nathanson MH, Malawista SE. Fc- and non-Fc-mediated phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by macrophages. *J Infect Dis* 1994; 170: 890–3.

Muir P, Oldenhoff WE, Hudson AP, Manley PA, Schaefer SL, Markel MD, Hao Z. Detection of DNA from a range of bacterial species in the knee joints of dogs with inflammatory knee arthritis and associated degenerative anterior cruciate ligament rupture. *Microb Pathog* 2007; 42: 47–55.

Murgia R, Cinco M. Induction of cystic forms by different stress conditions in *Borrelia burgdorferi*. *Apmis* 2004; 112: 57–62.

Mursic VP, Wanner G, Reinhardt S, Wilske B, Busch U, Marget W. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. *Infection* 1996; 24: 218–26.

Nadelman RB, Nowakowski J, Forseter G, Bittker S, Cooper D, Goldberg N,

McKenna D, Wormser GP. Failure to isolate *Borrelia burgdorferi* after antimicrobial therapy in culture-documented Lyme borreliosis associated with erythema migrans: report of a prospective study. *Am J Med* 1993; 94: 583–8.

Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 309–15.

Nicholson WL, Comer JA, Sumner JW, Gingrich-Baker C, Coughlin RT, Magnarelli LA, Olson JG, Childs JE. An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1510–6.

Nieto NC, Foley JE. Meta-analysis of coinfection and coexposure with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in humans, domestic animals, wildlife, and *Ixodes ricinus*-complex ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 9: 93–101.

O'Connell S, Granstrom M, Gray JS, Stanek G. Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentralbl Bakteriol* 1998; 287: 229–40.

O'Connor TP, Esty KJ, Hanscom JL, Shields P, Philipp MT. Dogs vaccinated with common Lyme disease vaccines do not respond to IR6, the conserved immunodominant region of the VlsE surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 458–62.

Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 670–5.

Oliver JH, Jr. Lyme borreliosis in the southern United States: a review. *J Parasitol* 1996; 82: 926–35.

Pantchev N, Schaper R, Limousin S, Norden N, Weise M, Lorentzen L. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. Parasitol Res 2009; 105 Suppl 1: S101–14.

Patrican LA. Absence of Lyme disease spirochetes in larval progeny of naturally infected *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) fed on dogs. J Med Entomol 1997; 34: 52–5.

Persing DH, Rutledge BJ, Rys PN, Podzorski DS, Mitchell PD, Reed KD, Liu B, Fikrig E, Malawista SE. Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. J Infect Dis 1994; 169: 668–72.

Philipp MT, Bowers LC, Fawcett PT, Jacobs MB, Liang FT, Marques AR, Mitchell PD, Purcell JE, Ratterree MS, Straubinger RK. Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. J Infect Dis 2001; 184: 870–8.

Picken RN, Strle F, Picken MM, Ruzic-Sabljic E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Cimperman J. Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. J Invest Dermatol 1998; 110: 211–4.

Piesman J, Gern L. Lyme borreliosis in Europe and North America. Parasitology 2004; 129 Suppl: S191–220.

Plier ML, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Kidd LB. Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. J Am Anim Hosp Assoc 2009; 45: 232–8.

Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK. Genetic variants

of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. J Clin Microbiol 2005; 43: 796–801.

Posey JE, Gherardini FC. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. Science 2000; 288: 1651–3.

Postic D, Assous MV, Grimont PA, Baranton G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. Int J Syst Bacteriol 1994; 44: 743–52.

Postic D, Assous M, Belfaiza J, Baranton G. Genetic diversity of *Borrelia* of Lyme borreliosis. Wien Klin Wochenschr 1996; 108: 748–51.

Qiu WG, Dykhuizen DE, Acosta MS, Luft BJ. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States. Genetics 2002; 160: 833–49.

Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 7203–16.

Reye AL, Hubschen JM, Sausy A, Muller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. Appl Environ Microbiol 2010; 76: 2923–31.

Rikihisa Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. Curr Opin Microbiol 2006; 9: 95–101.

Roberts DM, Carlyon JA, Theisen M, Marconi RT. The bdr gene families of the Lyme disease and relapsing fever spirochetes: potential influence on biology, pathogenesis, and evolution. Emerg Infect Dis 2000; 6: 110–22.

Robertson J, Guy E, Andrews N, Wilske B, Anda P, Granstrom M, Hauser U, Moosmann Y, Sambri V, Schellekens J, Stanek G, Gray J. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2097–102.

Rosa PA, Tilly K, Stewart PE. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 129–43.

Sampson JS, Wilkinson HW, Tsang VC, Brake BJ. Kinetic-dependent enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 1340–4.

Schoeler GB, Lane RS. Efficiency of transovarial transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in the western blacklegged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1993; 30: 80–6.

Scorpio DG, Dumler JS, Barat NC, Cook JA, Barat CE, Stillman BA, DeBisceglie KC, Beall MJ, Chandrashekar R. Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 223–9.

Seinost G, Dykhuizen DE, Dattwyler RJ, Golde WT, Dunn JJ, Wang IN, Wormser GP, Schriefer ME, Luft BJ. Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in humans. *Infect Immun* 1999; 67: 3518–24.

Silaghi C, Kohn B, Chirek A, Thiel C, Nolte I, Liebisch G, Pfister K. Relationship of molecular and clinical findings on *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 4413–4.

Skotarczak B. Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector. *Ann Agric Environ Med* 2009; 16: 1–8.

Speck S, Reiner B, Wittenbrink MM. Isolation of *Borrelia afzelii* from a dog. *Vet*

Rec 2001; 149: 19–20.

Stackebrandt E, Goebel B. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44: 846–9.

Stafford KC, 3rd, Cartter ML, Magnarelli LA, Ertel SH, Mshar PA. Temporal correlations between tick abundance and prevalence of ticks infected with *Borrelia burgdorferi* and increasing incidence of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1240–4.

Standaert SM, Yu T, Scott MA, Childs JE, Paddock CD, Nicholson WL, Singleton J, Jr., Blaser MJ. Primary isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from patients with febrile illnesses: clinical and molecular characteristics. *J Infect Dis* 2000; 181: 1082–8.

Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet* 2012; 379: 461–73.

Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 2001; 345: 115–25.

Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 1093–101.

Steere AC. Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme Connecticut. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118: 625–33.

Steere AC, McHugh G, Damle N, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 188–95.

Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, Appel MJ. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 111–6.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH, Erb HN. Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110: 874–81.

Straubinger RK, Krupka I, Pantchev N, Lorentzen L, Weise M. Single and dual infections with *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in German dogs - a serological research study. *Proceedings of the 3rd Canine Vector-Borne Disease (CVBD) Symposium* 2008: 46–54.

Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun* 2007; 31 Suppl 1: 79–84.

Suksawat J, Hegarty BC, Breitschwerdt EB. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 50–5.

Sum S, Hartmann K. Antikörperprävalenz gegen *Borrelia burgdorferi* in Süddeutschland [abstract]. *Tierärztl Prax* 2005: 142.

Tjernberg I, Sillanpaa H, Seppala I, Eliasson I, Forsberg P, Lahdenne P. Antibody responses to *Borrelia* IR(6) peptide variants and the C6 peptide in Swedish patients with erythema migrans. *Int J Med Microbiol* 2009; 299: 439–46.

Toepfer KH, Straubinger RK. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent: A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. *Vaccine* 2007; 25: 314–26.

Uilenberg G, Thiaucourt F, Jongejan F. On molecular taxonomy: what is in a name? *Exp Appl Acarol* 2004; 32: 301–12.

Von Loewenich FD, Baumgarten BU, Schroppel K, Geissdorfer W, Rollinghoff M, Bogdan C. High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum*

among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. J Clin Microbiol 2003; 41: 5033–40.

Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 633–53.

Weber A, Heim U, Schafer R. Incidence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in small animal practice in North Bavaria. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1991; 104: 384–6.

Wilske B, Preac-Mursic V, Gobel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J Clin Microbiol 1993; 31: 340–50.

Wilske B, Jauris-Heipke S, Lobentanzer R, Pradel I, Preac-Mursic V, Rossler D, Soutschek E, Johnson RC. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. J Clin Microbiol 1995; 33: 103–9.

Wilske B, Busch U, Eiffert H, Fingerle V, Pfister HW, Rossler D, Preac-Mursic V. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. Med Microbiol Immunol 1996; 184: 195–201.

Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. Vector Borne Zoonotic Dis 2003; 3: 215–27.

Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 49: 13–21.

Woldehiwet Z. Tick-borne fever: a review. Vet Res Commun 1983; 6: 163–75.

Woldehiwet Z. Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *Vet J* 2008; 175: 37–44.

Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 2010; 167: 108–22.

Wormser GP, Aguero-Rosenfeld ME, Nadelman RB. Lyme disease serology: problems and opportunities. *Jama* 1999; 282: 79–80.

Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klemperer MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1089–134.

www.megedi.com (2011) Zecken - Zeckenbiss - Wie Sie sich vor Zecken schützen können.

Xu Y, Johnson RC. Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2679–85.

Zhang L, Liu Y, Ni D, Li Q, Yu Y, Yu XJ, Wan K, Li D, Liang G, Jiang X, Jing H, Run J, Luan M, Fu X, Zhang J, Yang W, Wang Y, Dumler JS, Feng Z, Ren J, Xu J. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *Jama* 2008; 300: 2263–70.

Zhi N, Ohashi N, Rikihisa Y. Multiple p44 genes encoding major outer membrane proteins are expressed in the human granulocytic ehrlichiosis agent. *J Biol Chem* 1999; 274: 17828–36.

X. DANKSAGUNG

Ich danke Frau Univ.-Prof. Katrin Hartmann. Sie war und ist vieles für mich, Lehrerin, Doktormutter und Mentorin. Ich danke ihr für ihre große Geduld, ihr Vertrauen in mich und ihre Energie. Sie hat für mich in meinem Werdegang einen ganz besonderen Stellenwert. Dafür bin ich ihr für immer dankbar.

Bei Herrn Univ.-Prof. Reinhard K. Straubinger möchte ich mich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und der Veröffentlichungen bedanken. Ich danke ebenso Frau Dr. med. vet. Inke Krupka-Dyachenko für die außerordentliche Hilfe bei der interessanten und intensiven Arbeit im Institut für Immunologie der veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig; und auch für die schöne Zeit dort. Auch danke ich Christina für ihre wertvolle Hilfe im Labor.

Ich danke Frau Dr. med. vet. Carola Sauter-Louis für die großartige Unterstützung bei der Statistik. Mit ihrer großen Freundlichkeit und Geduld hat sie mir sehr geholfen.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. Elisabeth Müller für die Unterstützung bei den Veröffentlichungen.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen der Medizinischen Kleintierklinik. Das Arbeiten und Lernen in diesem besonderen Team waren für mich von großer Bedeutung und haben mich sehr geprägt. Besonders dankbar bin ich für die Freundschaften, die hier entstanden sind.

Ganz besonders danke ich meiner Familie. Meinem Mann Marc, meiner Mutter Ursula, meinen Geschwistern Benedikt und Cordula, die Alles für mich sind.

Ich danke meiner Patin Tinda, die mir wahre Patin ist.

Ich danke Bärbel und Stefan für ihr Vertrauen in mich.

An dieser Stelle soll Platz sein für den Dank an besondere Gefährten, die mich treu und liebevoll begleitet haben, Lilly-June, Tolstoi und Beauty.

Mein letzter Dank gilt meinem Vater Siegfried. Ich danke ihm für seine Liebe, und dass er mir Vater war. Er ist immer bei mir.